

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 469**

51 Int. Cl.:

C07J 1/00 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)
C07J 43/00 (2006.01)
C07J 51/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2013 PCT/FR2013/053040**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14091158**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013 E 13820805 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2931740**

54 Título: **Derivados de testosterona con una sustitución carboxialquilo en la posición 3 y sus utilizaciones para la producción de los esteroides marcados para la determinación de la concentración de testosterona en una muestra biológica**

30 Prioridad:

13.12.2012 FR 1261982

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.01.2018

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**COSIN, PERRINE y
GUO, YUPING**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 649 469 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

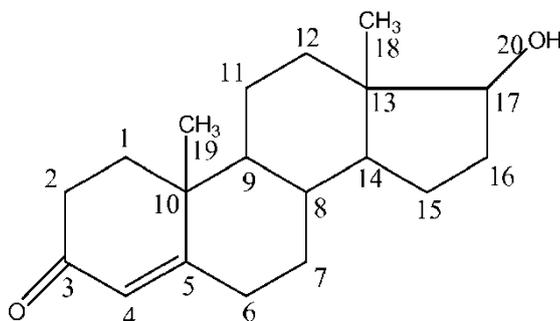
Derivados de testosterona con una sustitución carboxialquilo en la posición 3 y sus utilizaciones para la producción de los esteroides marcados para la determinación de la concentración de testosterona en una muestra biológica

La presente invención se refiere al campo de la detección de la testosterona en una muestra biológica. En particular, se refiere a nuevos compuestos derivados de testosterona particularmente útiles en los inmunoensayos, sus procedimientos de preparación, así como sus utilizaciones para la determinación de la testosterona.

El andrógeno 17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona, comúnmente denominado testosterona, es la hormona andrógena principal en el hombre. Se segrega por las células de Leydig en los testículos, bajo la influencia de una hormona hipofisaria: la LH (Hormona Luteinizante).

La testosterona circula en mayor parte unida a proteínas de transporte, principalmente la SHBG (Sex Hormone-Binding Globuline) y la albúmina. La testosterona libre presenta del 1 al 2% de la testosterona total (Litwack G., 1992).

La fórmula desarrollada de la testosterona con la numeración de los átomos se representa a continuación.



En el hombre, la testosterona actúa sobre la espermatogénesis, sobre la maduración de los órganos genitales externos, sobre los caracteres sexuales secundarios (barba, pelos púbicos y axilares) y sobre el anabolismo protéico. Así la determinación de la testosterona en el hombre permite evaluar la función esteroidogénica testicular. Un porcentaje de testosterona sérica superior a 3,2 ng/ml se considera como normal, un porcentaje inferior a 2 ng/ml permite diagnosticar un hipogonadismo o una feminización del organismo. El límite superior de los valores normales en el hombre es 8-9 ng/ml.

En la mujer, la testosterona se segrega en baja cantidad por los ovarios y las glándulas suprarrenales. Proviene esencialmente de la conversión periférica de los precursores (en particular la androstenediona). Así, la determinación de la testosterona en la mujer permite explorar la secreción androgénica. Unos porcentajes elevados en testosteronas pueden estar relacionados con un síndrome de ovarios poliquísticos, un tumor ovárico o suprarrenal, una hiperplasia, unos suprarrenales o un hirsutismo idiopático.

Existen varios métodos disponibles para la cuantificación de la testosterona en muestras biológicas. Estos métodos pueden ser clasificados en 2 grupos principales:

(1) la espectrometría de masa (MS)

Esta técnica de análisis permite la determinación de la masa molecular de los compuestos analizados, así como su identificación y su cuantificación. Aplicada a una mezcla compleja como un fluido biológico, necesita acoplarse a una técnica separativa que permite reducir su complejidad. Se trata lo más frecuentemente de la cromatografía en fase gaseosa (GC) o de la cromatografía en fase líquida (LC). La espectrometría de masa en tándem (MS/MS) combina 2 analizadores. Los compuestos iónicos seleccionados en el primer analizador se analizan de manera más fina en el segundo. Este doble análisis permite aumentar de manera significativa la especificidad del método. Así, la testosterona se puede determinar mediante varios métodos que asocian una técnica separativa y una técnica MS:

- cromatografía en fase gaseosa – espectrometría de masa con dilución isotópica (ID-GCMS) (Moneti G; *et al.*, 1987; Wudy, S.A., *et al.*, 1992).

- cromatografía en fase líquida – espectrometría de masa en tándem con dilución isotópica (ID-LC-MS/MS) (Thienpont L, *et al.*, 2008).

(2) los inmunoensayos con marcadores

Los procedimientos de inmunoensayo, también denominados ensayos inmunológicos o ensayos inmuno-químicos, implican unas reacciones inmunológicas entre el analito a detectar, la testosterona, y al menos un primer compuesto que es una pareja de unión a este analito. Como el análisis de la testosterona se realiza por competición, el procedimiento implica también otro compuesto que entra en competición con la testosterona a determinar, el cual es un derivado de testosterona. Uno de los dos compuestos estará entonces marcado para la visualización. Se denominará este compuesto marcado, conjugado marcado.

Por supuesto, el término “inmuno” en “inmunoensayo” por ejemplo, no se debe considerar en la presente solicitud como indicando estrictamente que la pareja de unión es una pareja inmunológica, tal como un anticuerpo. En efecto, el experto en la materia utiliza también ampliamente este término cuando la pareja de unión, también denominada ligando, no es una pareja inmunológica, sino que es por ejemplo un receptor del analito que se quiere determinar. Así, se conoce hablar de análisis ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para análisis que utilizan unas parejas de unión no inmunológicas, también denominadas más ampliamente en inglés “Ligand Binding Assay”, que se podría traducir por “análisis que utiliza la unión a un ligando”, mientras que el término “inmuno” está incluido en el acrónimo ELISA. Para más claridad, la solicitante utilizará en toda la solicitud el término “inmuno” para cualquier análisis que utilice una pareja de unión, incluso cuando no es una pareja inmunológica.

Según el tipo de conjugado marcado que se utiliza y el tipo de señal que este conjugado puede generar, se distinguen tres tipos de inmunoensayo:

- los inmunoensayos radio-isotópicas (RIA) (Cekan, S.Z., 1979), que pueden estar precedidas de una técnica de separación como la cromatografía líquida de alto rendimiento (Ueschiba, H. *et al.*, 1991),

- los análisis inmuno-enzimáticos o EIA (enzyme linked immunoassay).

Según el sustrato enzimático seleccionado, se puede obtener una señal colorimétrica (ELISA) (Rassasie, M.J., *et al.*, 1992), una señal de fluorescencia (ELFA) o una señal quimioluminiscentes (CLIA) (Stabler T.V., *et al.*, 1991)

- los inmunoensayos electroquimioluminiscentes (Owen, W.E., *et al.*, 2010).

Los dos últimos tipos de inmunoensayo son entonces denominados inmunoensayos no radio-isotópicas.

El desarrollo en los años 60 de los métodos RIA ha revolucionado la cuantificación de los esteroides. Los trazadores utilizados eran entonces unos derivados de testosterona radioactivos (^3H o ^{125}I) tales como la testosterona-3-(O-carboximetil)-oxima (o testosterona-3-O-CMO) marcada (Cook B. y Beastall G.H., 1987). Sin embargo, estos métodos tenían en particular como inconveniente el tratamiento de los residuos radioactivos y la duración media de vida útil de los reactivos marcados relativamente corta.

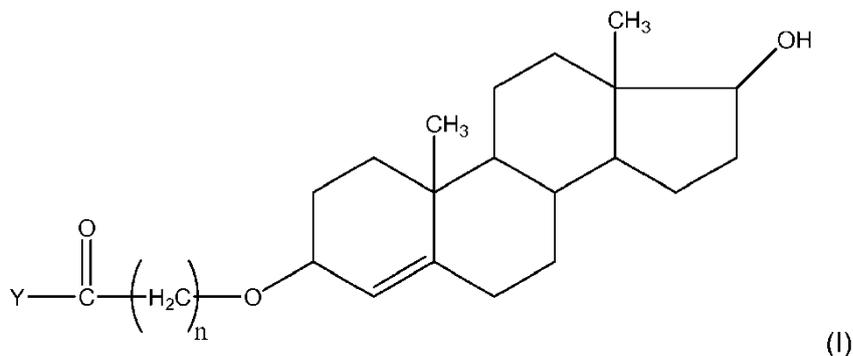
Por ello, los procedimientos y reactivos de inmunoensayo no-radioisotópicos se han desarrollado en detrimento de RIA, que se utiliza raramente en la actualidad. Sin embargo, los inmunoensayos realizados sobre las plataformas automatizadas de inmunoanálisis no son capaces de detectar de manera justa y reproducible unas cantidades de testosterona inferiores a 1,5 ng/ml en condición de utilización de rutina (Rosner W. *et al.*, 2007). Esto plantea un problema para el buen tratamiento de los hombres hipogonadales que presentan frecuentemente tales porcentajes séricos.

Asimismo, se establece también que la mayoría de los métodos actuales de inmunoensayo no radioisotópicos de la testosterona son inexactos cuando se utilizan en la mujer ya que no poseen una sensibilidad analítica suficiente para detectar y cuantificar los porcentajes de testosterona presentes en la circulación sanguínea. Los valores de referencia para la testosterona total en las mujeres de 18 a 49 años de edad son de 0,04 a 0,44 ng/ml (Demers L.M., 2010), mientras que los límites de detección o también de sensibilidad analítica de los inmunoensayos automatizados para la testosterona son del orden de 0,1 ng/ml. Así, Shrivastav T. G., 2002 ha mostrado que un análisis por ELISA de la testosterona utilizando como trazador la testosterona-3-O-CMO conjugada con la peroxidasa de rábano picante daba un sesgo cuando la cantidad de testosterona en la muestra a analizar era reducida, en el sentido en el que la concentración obtenida era todavía ampliamente superior a la realmente contenida en la muestra determinada. Fiet J *et al.*, 2004 han descrito también la utilización de tal compuesto 3-O-CMO, también denominado compuesto 3-CMO, como trazador, el cual se biotiniló previamente. Sin embargo, la sensibilidad de determinación de la testosterona en intervalos más bajos utilizando este compuesto no es buena. Además, tal compuesto 3-O-CMO es complicado de producir en la medida en la que se encuentra en forma de una mezcla de esteroisómeros, también denominada mezcla isomérica. Para obtener un análisis reproducible, se recomienda entonces efectuar una separación de los esteroisómeros antes de la utilización en el inmunoensayo, lo que es complicado y conlleva una degradación del rendimiento de síntesis.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de una determinación de testosterona que sea suficientemente sensible y por lo tanto clínicamente utilizable en las muestras que contienen una concentración baja en testosterona y que utilizan unos compuestos que se pueden preparar de manera simplificada.

La solicitante ha encontrado, contra todo pronóstico, nuevos derivados de testosterona que permiten paliar los inconvenientes de los inmunoensayos de la técnica anterior, en el sentido en el que su utilización en un análisis inmunológico por competición, en particular como trazador, permitía obtener un análisis altamente sensible y en particular en los intervalos más bajos de testosterona, y por lo tanto la preparación es fácil.

5 Así, un objeto de la invención se refiere a unos compuestos derivados de la testosterona de fórmula general (I) siguiente:



10 en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa un grupo de acoplamiento activado o listo para activarse que permite la formación de un enlace de amida con una amina primaria de una molécula.

15 Otro objeto de la invención comprende un conjugado que comprende o que está constituido de un derivado de testosterona de fórmula (I) tal como se ha descrito anteriormente y de un marcador, así como un kit que comprende tales compuestos.

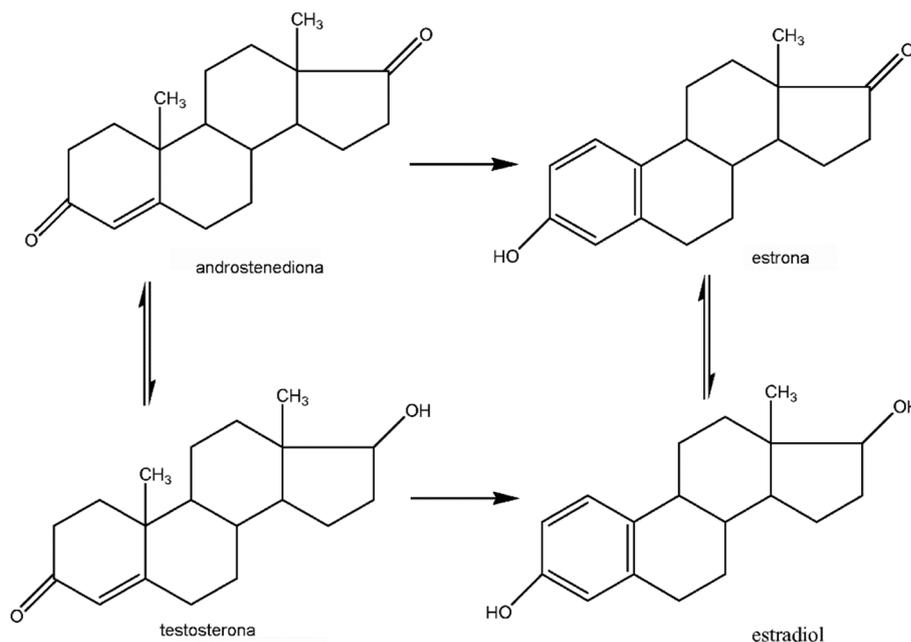
20 Otro objeto de la invención comprende la utilización de dicho conjugado en un procedimiento de análisis inmunológico de la testosterona, en particular como trazador.

Finalmente, un último objeto se refiere a un procedimiento de preparación de dichos derivados de testosterona.

25 La presente invención se refiere por lo tanto a los compuestos de fórmula (I) tales como se han descrito anteriormente, los cuales son particularmente útiles para un ensayo de inmunoensayo por competición, y en particular para la preparación de trazador.

30 En efecto, la solicitante ha encontrado, contra todo pronóstico, que la modificación de la testosterona en la posición 3, por reducción del carbonilo en hidroxilo, e introducción de un brazo, permitía dar un derivado de la testosterona que no está en forma de mezcla isomérica y que es particularmente ventajoso cuando se utiliza en una determinación de la testosterona, y en particular como trazador, en el sentido en el que la determinación de la testosterona es particularmente sensible y permite detectar unas concentraciones de testosterona débiles.

35 Como se muestra por Cook B. y Beastall G.H, 1987, las hormonas esteroideas son estructuralmente muy similares. Así, la testosterona, el estradiol, la estrona y la androstenediona difieren los unos de los otros sólo por la presencia de una función hidroxilo o cetona en las posiciones 3 y 17, así como por la presencia o no de un grupo metilo en la posición 10, como lo muestra a continuación:



La más leve modificación de los sustituyentes de la estructura de base, y en particular en la posición 3 o en la posición 17, hace pasar de una hormona esteroidea a otra.

5
 10
 Contra todo pronóstico, los compuestos de fórmula (I) de la invención, a pesar de la modificación de la estructura química de base de la testosterona, debido a la reducción del carbonilo en hidroxilo en la posición 3 y por lo tanto a su similitud estructural a nivel del grupo funcional en esta posición con el estradiol, el analito que no se desea analizar, son particularmente muy adecuados para su utilización para la determinación de la testosterona.

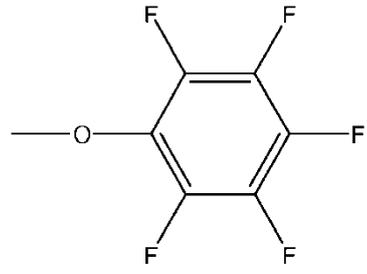
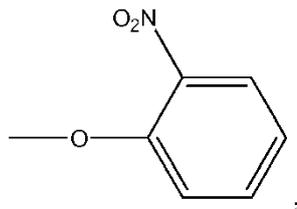
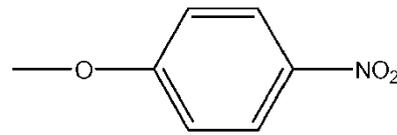
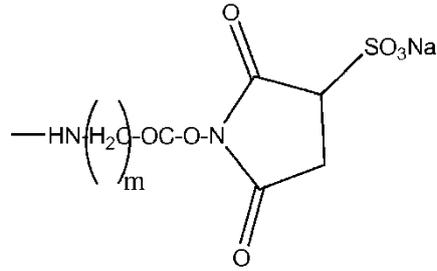
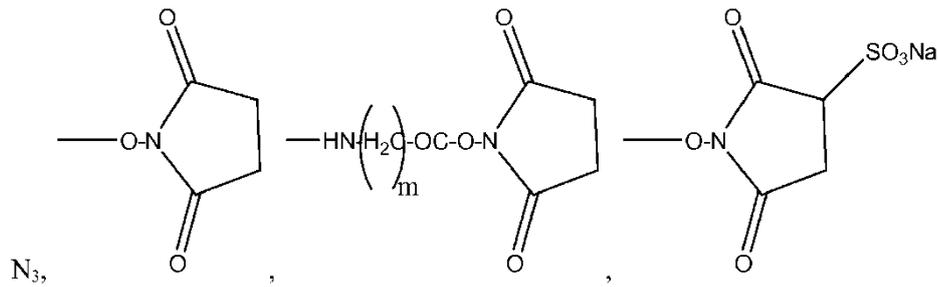
15
 Los compuestos de la invención se caracterizan por lo tanto por la fórmula (I) tal como se da anteriormente, en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa un grupo de acoplamiento activado o listo para activarse que permite la formación de un enlace de amida con una amina primaria de una molécula.

20
 Estos compuestos no deben ser demasiado hidrófobos y el valor de n debe controlarse para ello. Según un modo de realización, n está comprendido entre 1 y 5 y preferentemente entre 1 y 3. Según otro modo de realización particular, n es 1.

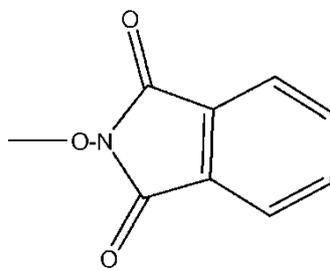
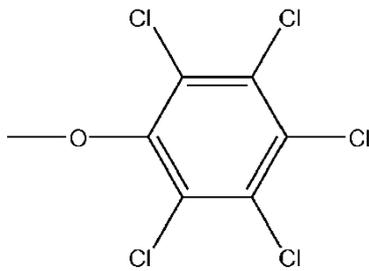
25
 Las moléculas que se pueden acoplar con los derivados de testosterona de la invención son todas las moléculas que poseen naturalmente una amina primaria, tales como una proteína, o bien todas las moléculas que han sido modificadas químicamente para incluir tal amina primaria, por ejemplo una biotina modificada, que presenta una amina primaria.

30
 Por grupo de acoplamiento activado o listo para activarse, se entiende un grupo funcional adecuado, llegado el caso después de la activación, para permitir el acoplamiento del derivado de testosterona de la invención con el grupo funcional amina primaria de la molécula de acoplamiento. Este grupo puede también denominarse grupo saliente ya que ya no existirá en el conjugado formado entre el derivado de testosterona y la molécula de amina primaria. Este grupo saliente se disociará así del resto de la molécula durante la reacción de sustitución nucleófila con el grupo nucleófilo amina primaria de la molécula de acoplamiento de interés. El grupo saliente se disociará directamente cuando se denomine como ya activado, o bien se disociará después de la activación cuando se denomine listo para activarse.

35
 Por grupo de acoplamiento activado, se entiende por lo tanto un grupo que permite formar directamente un enlace de amida, sin que este grupo tenga la necesidad de ser modificado. A título de ejemplo, se pueden citar los grupos siguientes:



5

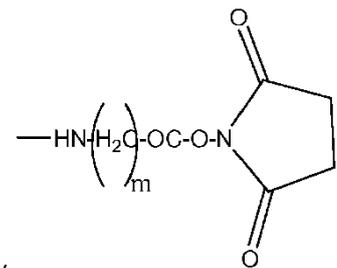


, y , siendo m un número entero, preferentemente comprendido entre 1 y 10, lo que constituye un modo de realización de la invención.

10 Por grupo de acoplamiento listo para activarse, se entiende por lo tanto cualquier grupo que debe activarse, mediante métodos conocidos por el experto en la materia, para ser capaz de formar un enlace de amida. Tales grupos poseen un grupo -OH o -COOH. A título de ejemplos, se pueden citar los grupos -OH y -NH-(CH₂)_m-COOH, siendo m un número entero, preferentemente comprendido entre 1 y 10, lo que constituye un modo de realización de la invención.

15

Según un modo de realización particular de la invención, m está comprendido entre 1 y 5, o también entre 1 y 3.

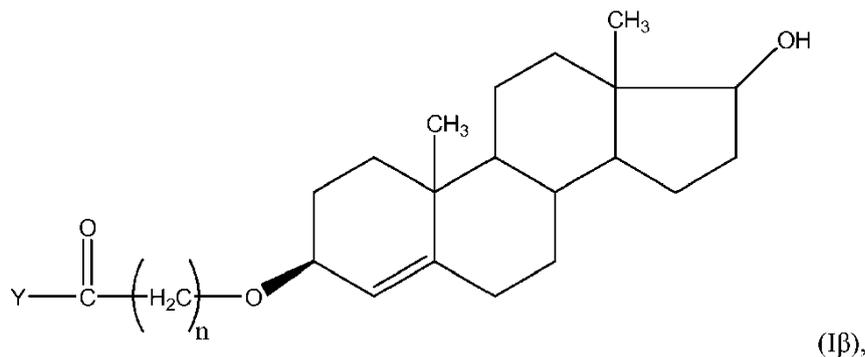


Según otro modo de realización, Y se selecciona entre -OH, -NH-(CH₂)_m-COOH, y estando m comprendido entre 1 y 10 y siendo preferentemente igual a 1.

20

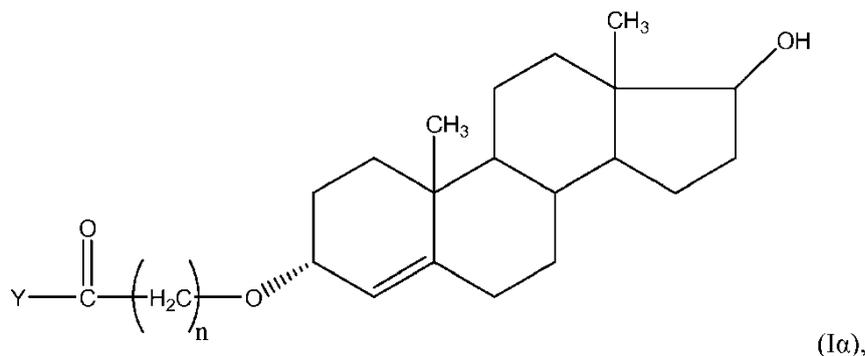
Los compuestos particularmente apropiados para la determinación de la testosterona, y en particular para la preparación de trazador, son los compuestos estereoquímicamente puros (isómeros α o β) a nivel del carbono en la posición 3, ya que no hay más doble enlace en la posición 3, como en la testosterona.

- 5 En efecto, en comparación con un compuesto 3-O-CMO en el que es más difícil controlar y reproducir la mezcla isomérica, ya que la relación entre los isómeros no son idénticas entre los lotes de síntesis, los compuestos estereoquímicamente puros (isómeros α o β) a nivel del carbono 3 son ventajosos en este sentido ya que son más reproducibles, de mejor calidad y por que los análisis en la que se utilizan son más fuertes.
- 10 Los derivados de testosterona de la invención de fórmula (I) en forma de isómero β en la posición 3 se representan por la fórmula (I β) siguiente:



- 15 siendo Y y n tales como se han descrito anteriormente.

Los derivados de testosterona de la invención de fórmula (I) en forma de isómero α en la posición 3 se representan por la fórmula (I α) siguiente:



- 20 siendo Y y n tales como se han descrito anteriormente.

25 En otras palabras, en la fórmula (I), el enlace entre el carbono en la posición 3 y el átomo de oxígeno del brazo, representado en forma de segmento de recta de la siguiente manera:

, incluye al mismo tiempo un enlace de tipo β y un enlace de tipo α .

30 Esto será también aplicable a todos los compuestos descritos a continuación que comprenden un enlace, entre el carbono en la posición 3 y el átomo de hidrógeno del brazo de dicho compuesto, en forma de segmento de recta, y

no en forma de flecha como a continuación: para designar un isómero β , o , para designar un isómero α .

35 Esto será en particular aplicable para los compuestos utilizados durante la descripción de los procedimientos de preparación de los derivados de testosterona de la invención, para los cuales no se añade la sigla α o β con la cifra que designa la fórmula.

Los compuestos de la invención se pueden utilizar de dos maneras en los procedimientos de análisis de la testosterona por inmunoensayo por competición, tales como los ensayos diagnósticos. O bien se utilizan tal cual, o bien se utilizan acoplados a otra molécula para formar un conjugado. Dicha otra molécula es un marcador, o bien un brazo químico o "linker", o bien un compuesto químico cuyo acoplamiento con un derivado de testosterona presenta un interés para la realización de un análisis de la testosterona por inmunoensayo por competición.

Así, la presente invención tiene también por objeto los conjugados que comprenden o que están constituidos de un derivado de testosterona tales como se han descrito anteriormente y de otra molécula, en particular de un marcador o de un brazo químico.

Por marcador, se entiende cualquier molécula que contiene un grupo amina primaria, directamente sin modificación química, o después de la modificación química para incluir tal grupo, molécula la cual es capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitativa de estos marcadores de detección directa consiste en:

* las enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,

* los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,

* las moléculas radioactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , y

* las moléculas fluorescentes tales como Alexa o ficocianinas.

* las sales electroquimiluminiscentes tales como unos derivados órgano-metálicos a base de acridinio o de rutenio.

También se pueden utilizar unos sistemas indirectos de detección, como por ejemplo unos ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. El ligando corresponde entonces al marcador para constituir, con el derivado de testosterona, el conjugado de la invención.

Las parejas ligando/anti-ligando son bien conocidas por el experto en la materia, lo que es el caso, por ejemplo, de las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido.

El anti-ligando puede entonces ser detectable directamente por los marcadores de detección directa descritos anteriormente o ser el mismo detectable por otra pareja ligando/anti-ligando, y seguidamente.

Estos sistemas indirectos de detección pueden conducir, en algunas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y se podrá referirse a las solicitudes de patente anteriores FR98/10084 o WO-A-95/08000 de la solicitante.

Según el tipo de marcado utilizado, el experto en la materia añadirá unos reactivos que permiten visualizar el marcado o la emisión de una señal detectable mediante cualquier tipo de aparato de medición apropiado como, por ejemplo, un espectrofotómetro, un espectrofluorímetro o también una cámara de alta definición.

Por brazo químico o "linker" se entiende cualquier molécula que contiene un grupo amina primaria, directamente sin modificación química, o después de la modificación química para incluir tal grupo, molécula la cual es capaz de fijación sobre una fase sólida, de manera covalente o no covalente, de manera selectiva o no selectiva.

Como se ha indicado anteriormente, los derivados de testosterona o los conjugados de la invención son particularmente útiles para la determinación *in vitro* de la concentración en testosterona en una muestra biológica, lo que constituye otro objeto de la invención.

La muestra biológica en la que el procedimiento de la invención se puede realizar es cualquier muestra biológica animal, preferentemente humana, susceptible de contener testosterona, en la que un inmunoensayo se puede llevar a cabo. Estas muestras son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Las muestras utilizadas en el procedimiento de determinación se pueden modificar previamente o no antes de su utilización. A título de ejemplo de tales muestras no previamente modificadas, se pueden citar los fluidos biológicos tales como la sangre total, orina, líquido cefalo-raquídeo, líquido seminal, esperma, leucorreas (secreciones vaginales), moco cervical, lavado cervicovaginal, lavado rectal, saliva, lavado bronco-alveolar y líquido amniótico. A título de ejemplos de muestra previamente modificada, también denominada derivado de muestra, se puede citar el suero, el plasma, las células que se recuperan a partir de una biopsia o tras una cirugía y que se ponen en cultivo *in vitro*. La determinación de la concentración de testosterona podrá entonces realizarse en el sobrenadante de cultivo o también en el lisado celular.

La determinación de la concentración en testosterona en la muestra biológica se puede realizar mediante un procedimiento de inmunoensayo, también denominado análisis inmunológico, por competición, el cual comprende las etapas que consisten en:

- 5 a) poner en presencia, dentro de dicha muestra, (i) una pareja de unión de la testosterona y (ii) un compuesto seleccionado entre un derivado de testosterona y un conjugado tales como se han descrito anteriormente, siendo uno de dichos componentes (i) y (ii) adaptado para emitir una señal,
- 10 b) eventualmente dejar un lapso de tiempo suficiente para permitir la reacción de competición, y
- c) medir la intensidad de la señal y deducir la concentración en testosterona presente en dicha muestra biológica por comparación con una curva de calibración que establece una relación entre intensidad de la señal medida y concentración en testosterona.

15 El análisis inmunológico por competición es un análisis ampliamente conocido por el experto en la materia. Consiste en determinar el analito, aquí la testosterona, en la muestra, creando una competición entre el analito de la muestra y un derivado de este analito, aquí el derivado de testosterona. La reacción inmunológica se pone entonces en evidencia gracias a la presencia de un trazador.

20 El derivado del analito se puede utilizar en la reacción de competición, como se ha indicado anteriormente, sin acoplamiento previo o después del acoplamiento a un marcador para formar un conjugado o trazador.

25 El análisis inmunológico necesita también la utilización de una pareja de unión de la testosterona frente a la cual el derivado de analito y el analito entran en competición. Cuando el derivado de analito no está acoplado a un marcador (no es el trazador sino la pareja de captura), la pareja está entonces marcada para constituir el trazador de la reacción. Cuando el derivado de analito está acoplado a un marcador (es entonces el trazador), la pareja de unión se vuelve entonces la pareja de captura.

30 La señal medida emitida por el trazador es entonces inversamente proporcional a la cantidad de testosterona de la muestra.

35 Por pareja de unión de la testosterona, se entiende cualquier molécula capaz de unirse a la testosterona. A título de ejemplo de pareja de unión de la testosterona, se pueden citar los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos, las nanofitinas, los receptores de la testosterona o cualquier otra proteína conocida por tener una interacción con la testosterona, como por ejemplo la SHBG.

Los anticuerpos parejas de unión son, por ejemplo, o bien unos anticuerpos policlonales, o bien unos anticuerpos monoclonales.

40 Los anticuerpos policlonales se pueden obtener por inmunización de un animal con, como inmunógeno, la testosterona diana, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los otros constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual está fijado un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, en particular el inmunógeno.

45 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la técnica de los hibridomas ampliamente conocido por el experto en la materia. Los anticuerpos monoclonales pueden también ser unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

50 A título de ejemplo de fragmentos de anticuerpos, se pueden citar los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, así como las cadenas scFv (Single chain variable fragment), dsFv (doble-stranded variable fragment). Estos fragmentos funcionales pueden ser obtenidos en particular por ingeniería genética.

55 Las nanofitinas (nombre comercial) son pequeñas proteína que, como los anticuerpos, son capaces de unirse a una diana biológica que permite así detectarla, capturarla o simplemente determinarla dentro de un organismo.

60 Las parejas de unión utilizadas pueden ser específicas o no de la testosterona. Se denominan específicas cuando son capaces de unirse de manera exclusiva o casi exclusiva a la testosterona. Se denominan no específicas cuando la selectividad de unión de la testosterona es débil y que son entonces capaces de unirse a otros ligandos, tales como otras proteínas o anticuerpos. Según un modo de realización preferido, se prefieren las parejas de unión específicas.

65 Las parejas de unión o los derivados de testosterona, cuando se utilizan en captura, se pueden unir o no a un soporte mediante cualquier técnica ampliamente conocida por el experto en la materia.

La segunda etapa b) del procedimiento de la invención es una etapa clásica de un procedimiento de análisis por competición.

5 La última etapa c) del procedimiento de la invención consiste en determinar la concentración en testosterona. Como se ha indicado anteriormente, la señal medida es inversamente proporcional a la cantidad de testosterona de la muestra. Para determinar la concentración, la señal se compara con una curva de calibración obtenida previamente mediante técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia. Así, por ejemplo, la curva de calibración se obtiene efectuando un análisis inmunológico utilizando la misma pareja de unión, así como unas cantidades crecientes de testosterona. Una curva se obtiene así poniendo en abscisas la concentración en testosterona y en ordenada la señal correspondiente obtenida después del análisis inmunológico.

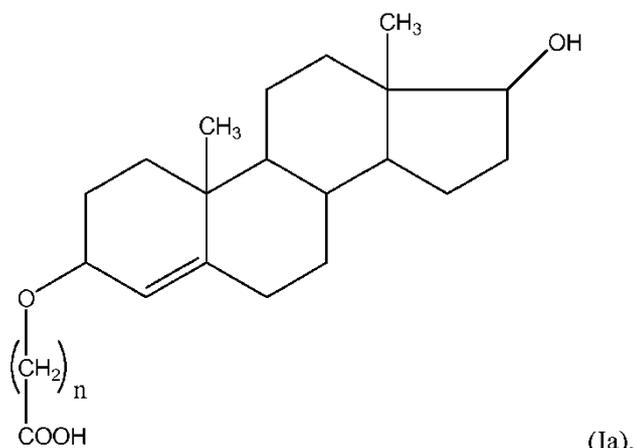
15 Cuando el compuesto (ii) es un conjugado de la invención tal como se ha descrito anteriormente, lo que constituye un modo de realización de la invención, la señal se obtiene por medio del marcado por el marcador como se ha descrito anteriormente.

20 Cuando el compuesto (ii) es un derivado de testosterona de la invención tal como se ha descrito anteriormente, es decir que no está unido a un marcador, la señal consiste en la lectura directa de la unión pareja de unión/derivado de testosterona, que puede llevarse a cabo por ejemplo por resonancia plasmónica de superficie o por voltametría cíclica.

25 Para realizar el procedimiento de determinación de la concentración de testosterona, los derivados de testosterona o conjugados de la invención tales como se han descrito anteriormente son incorporados en un kit de diagnóstico, lo que constituye otro objeto de la invención. Por supuesto, el kit puede comprender otros constituyentes necesarios para la realización del análisis inmunológico, tales como, por ejemplo, al menos una pareja de unión, un medio de calibración, unos tampones de lavado y unos reactivos que permiten la visualización del marcado o la emisión de una señal detectable.

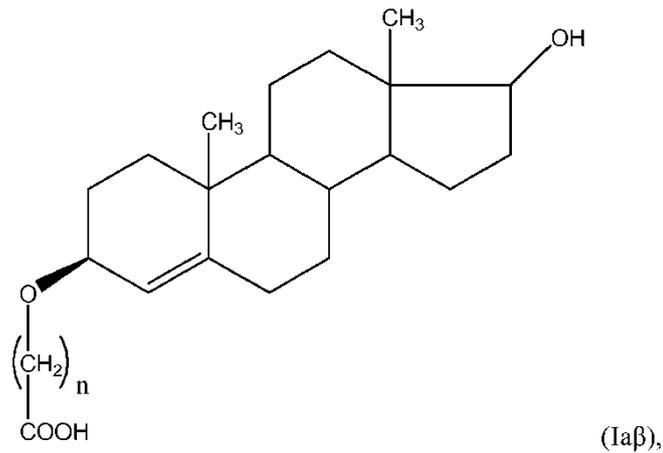
30 Los derivados de testosterona se han preparado mediante unos procedimientos particulares que permiten sintetizar unos compuestos que son o bien unos isómeros puros α , o bien unos isómeros puros β . Estos procedimientos son nuevos y constituyen otro objeto de la invención.

Los procedimientos de preparación de todos los derivados de testosterona de la invención de fórmula (I) pasan por la preparación de un primer compuesto clave que es un compuesto de fórmula (Ia) como a continuación:



35 en la que n es tal como se ha definido anteriormente. Asimismo, su utilización para la preparación de un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente constituye otro objeto de la invención.

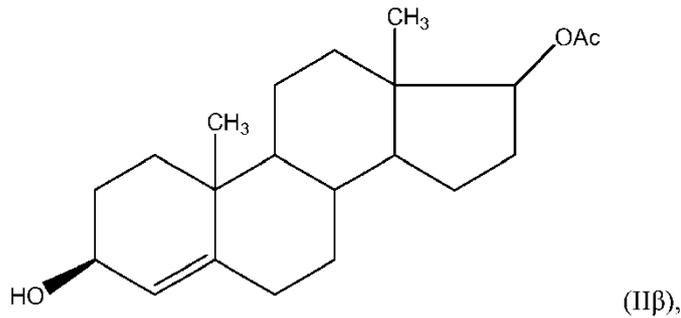
40 El compuesto de fórmula (Ia) es en realidad un derivado de testosterona de fórmula (I) en la que Y es el grupo -OH. Este derivado de testosterona puede estar en forma de isómero β en la posición 3; posee entonces la fórmula (Ia β) siguiente:



siendo n tal como se ha definido anteriormente.

5 Asimismo, otro objeto de la invención consiste en un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (Iaβ), el cual comprende o consiste en las etapas que consisten en:

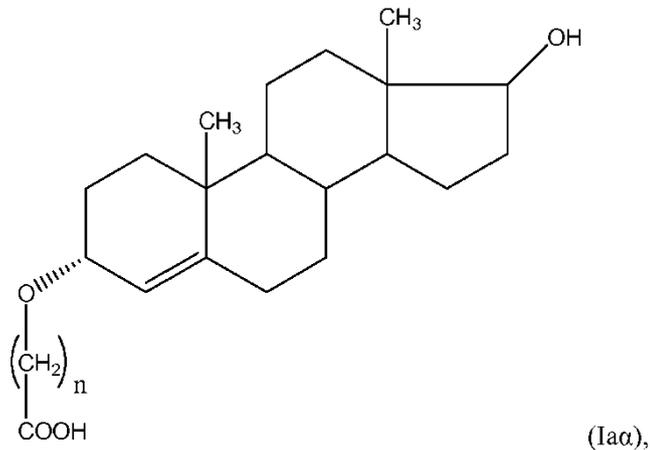
10 (1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (IIβ):



15 en la que Ac significa -CO-CH₃,

(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IIβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaβ).

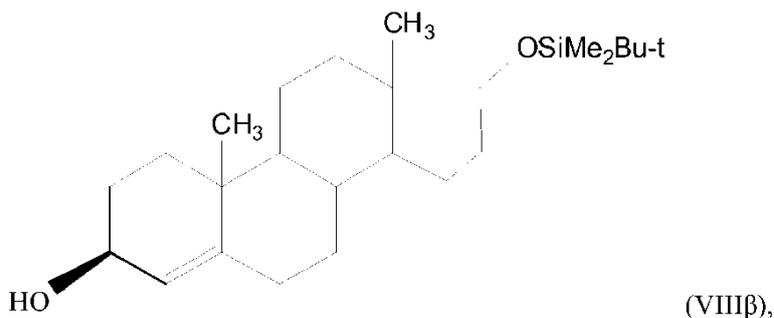
20 El derivado de testosterona de fórmula (I) en la que Y es -OH puede también estar en forma de isómero α en la posición 3; posee entonces la fórmula (Iaα) siguiente:



en la que n es tal como se ha descrito anteriormente.

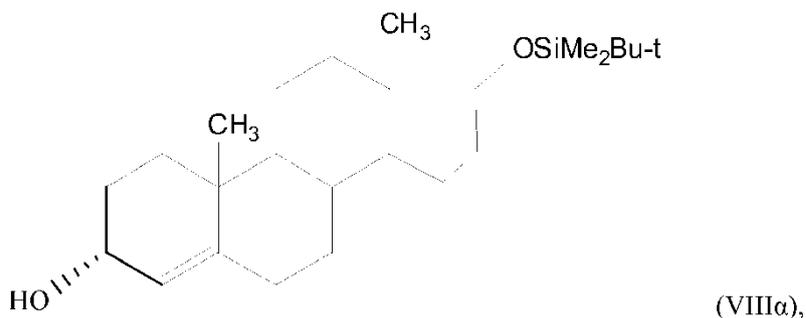
También otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (Ia α), procedimiento el cual comprende o consiste en las etapas que consisten en:

(1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIII β):



en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII β) así obtenido con de la trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIII α):



en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo, y

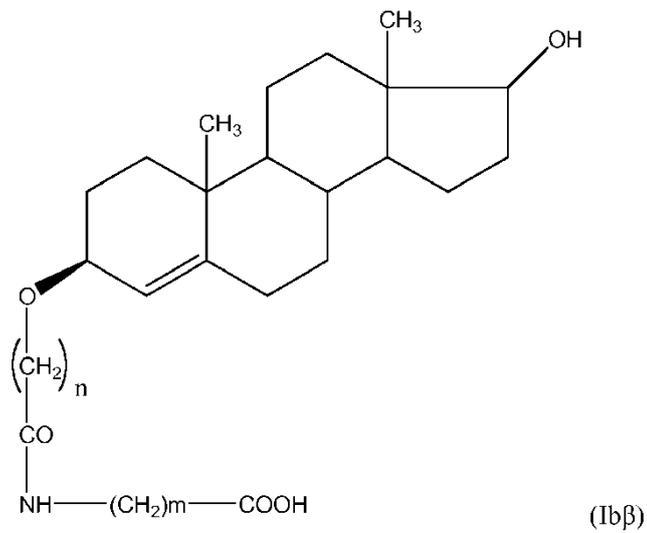
(3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII α) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ia α).

Los agentes reductores que se pueden utilizar aquí son cualquier agente reductor conocido por el experto en la materia para reducir estereoselectivamente un carbonilo en hidroxilo. A título de ejemplo, se puede citar el borohidruro de sodio.

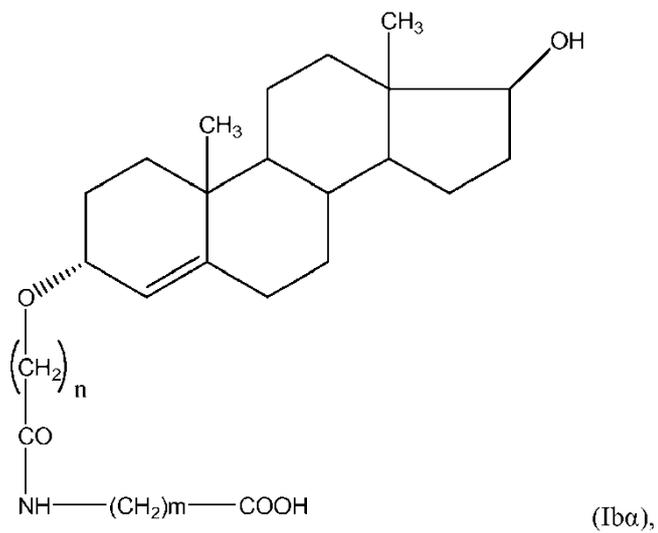
Los disolventes que se pueden utilizar aquí son todos los disolventes que permiten obtener una reacción que invierte la estereoquímica del hidroxilo. A título de ejemplo, se pueden citar los alcoholes tales como el metanol y el etanol.

Las bases que se pueden utilizar aquí son todas las bases minerales que permiten la saponificación para la vuelta a un grupo -OH. A título de ejemplo, se puede citar el hidróxido de sodio y el hidróxido de potasio.

Como se ha indicado anteriormente, los compuestos de fórmula (Ia β) o (Ia α) son clave para preparar otros derivados de testosterona de la invención. Así, por ejemplo, en la fórmula (I), cuando Y representa -NH-(CH₂)_m-COOH, los derivados de testosterona son entonces unos compuestos de fórmulas (Ib β) o (Ib α) siguientes según que sean respectivamente unos isómeros β o α en la posición 3:



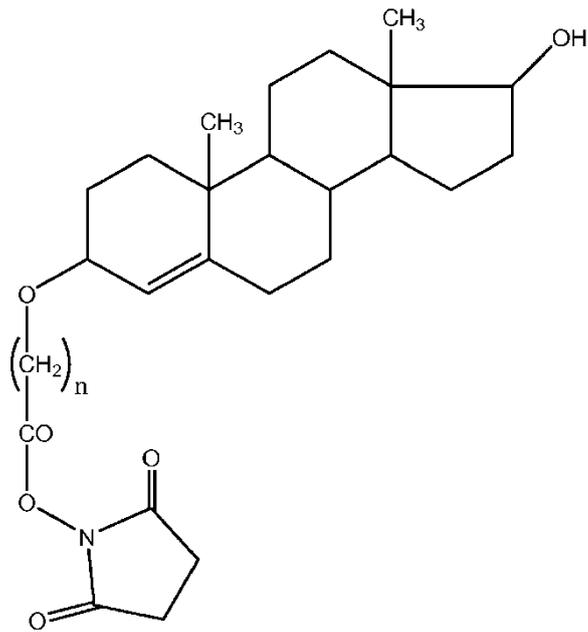
Y



5

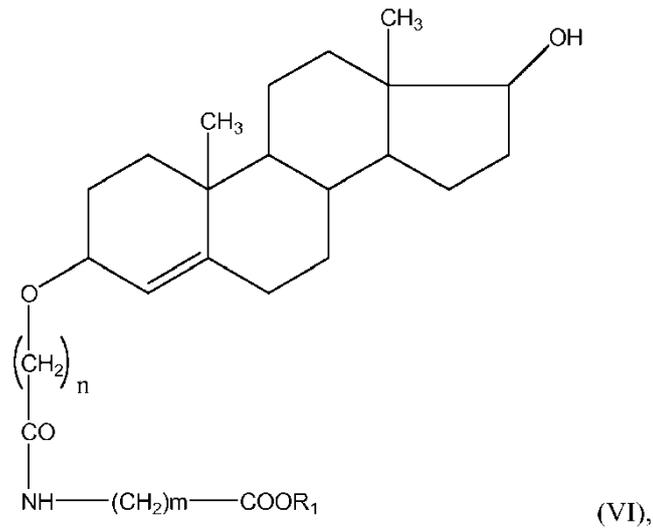
siendo n y m tales como se han definido anteriormente, los procedimientos de preparación comprenden las etapas anteriores (1) y (2) para los isómeros β y (1) a (3) para los isómeros α, así como las 3 etapas siguientes:

- 10 1. poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaβ) o (Iaα) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IV):



2. poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IV) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): $H_2N-(CH_2)_m-COOR_1$, en la que R_1 es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VI):

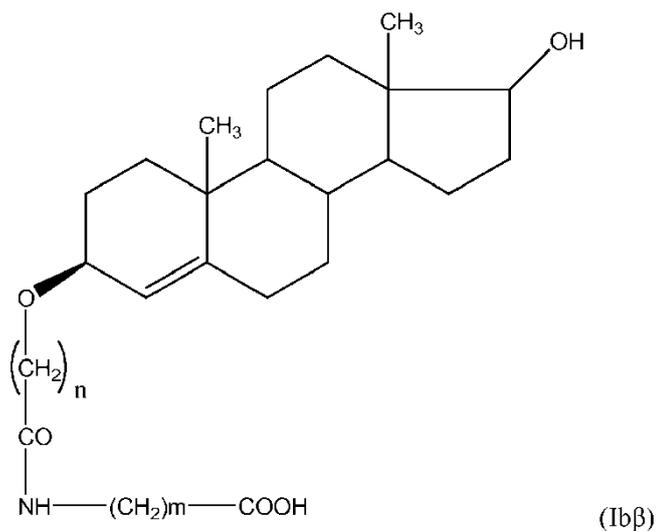
5



3. poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VI) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ib β) o (Ib α).

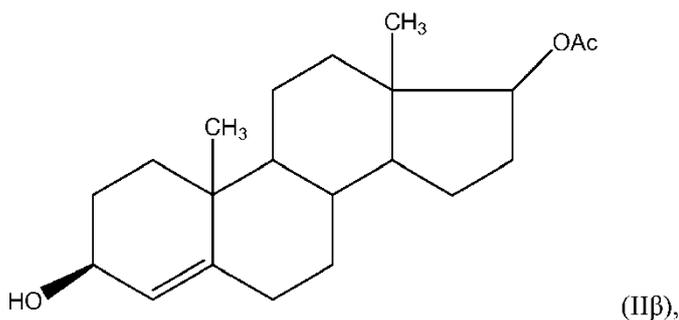
10

Así, según otro objeto, la invención comprende un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (Ib β) siguiente:



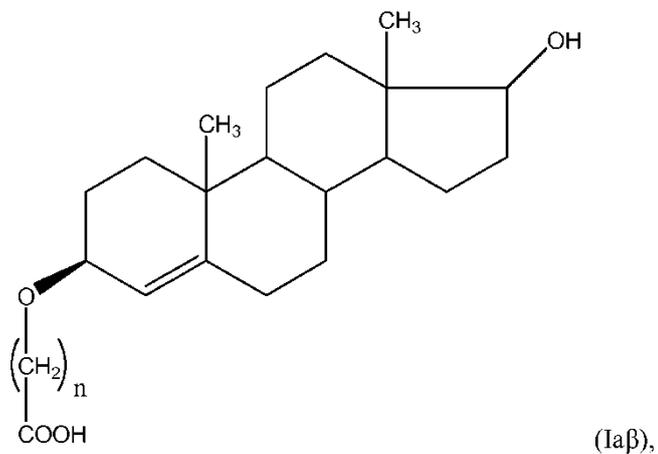
en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, m es un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende o que consiste en las etapas que consisten en:

- 5 (1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (IIβ):

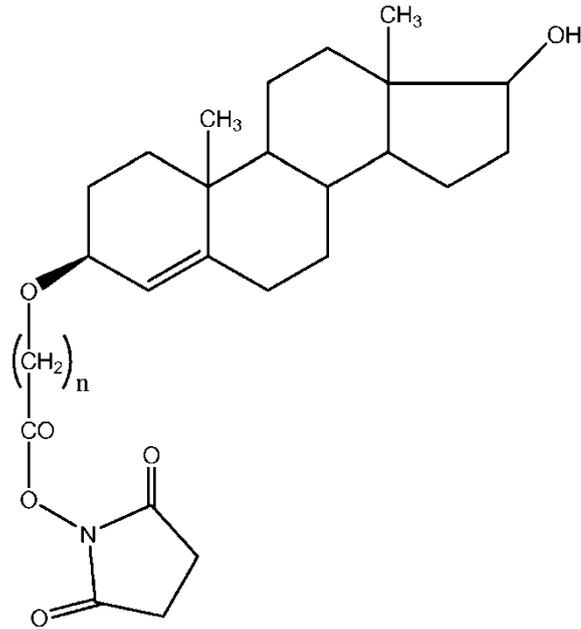


en la que Ac significa -CO-CH₃,

- 10 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IIβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaβ):

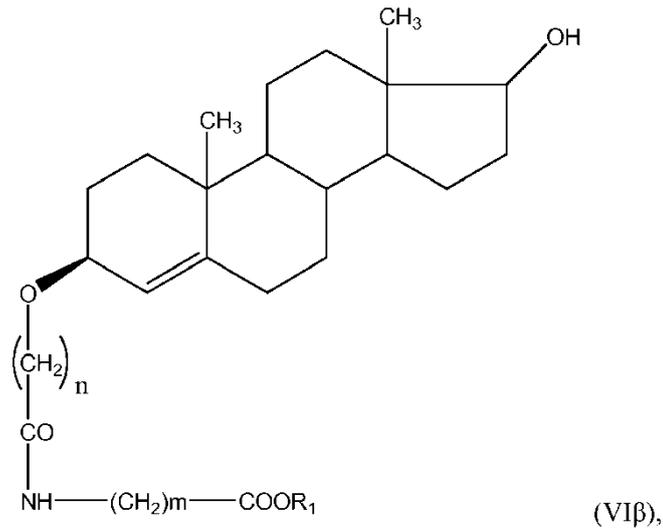


- 20 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaβ) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IVβ):



(4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IVβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): $H_2N-(CH_2)_m-COOR_1$, en la que R_1 es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VIβ):

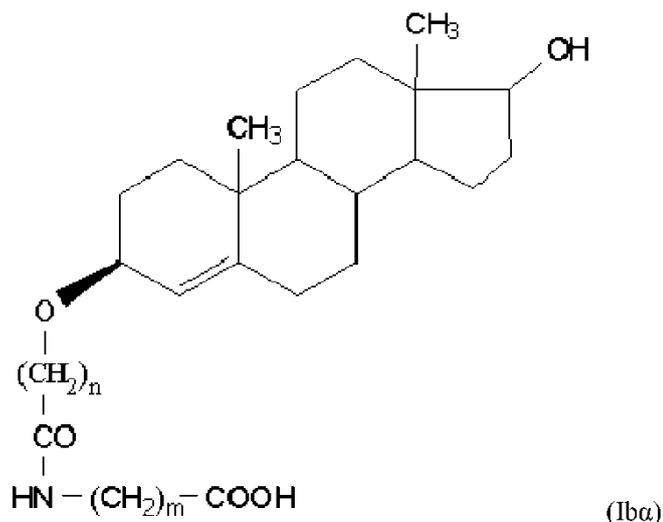
5



(5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIβ) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ibβ).

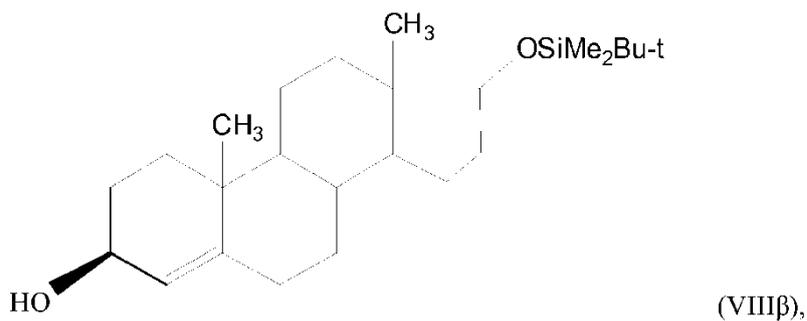
10

Según también otro objeto, la invención comprende un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (Ib α) siguiente:



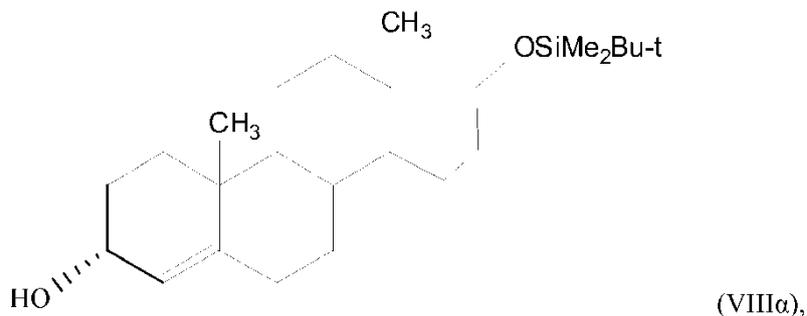
en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, m es un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende o que consiste en las etapas que consisten en:

- 5 (1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIII β):



en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

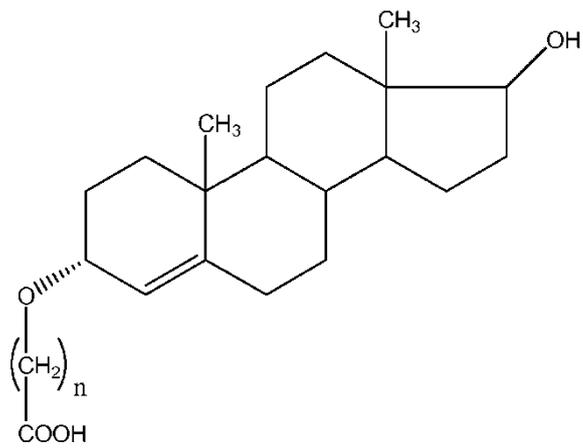
- 15 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII β) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIII α):



20 en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

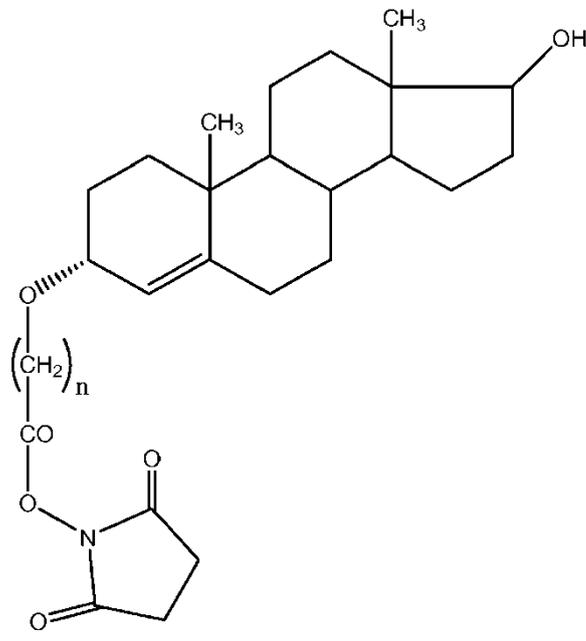
- (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII α) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ia α):

25



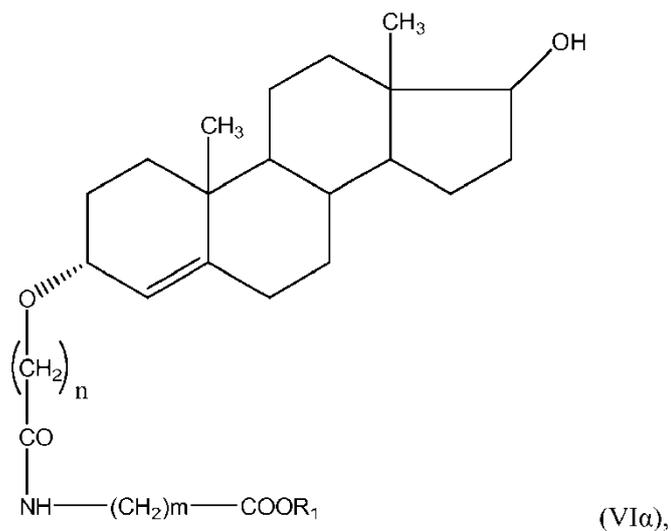
(4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ia α) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IV α):

5



(5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IV α) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): H₂N-(CH₂)_m-COOR₁, en la que R₁ es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VI α):

10

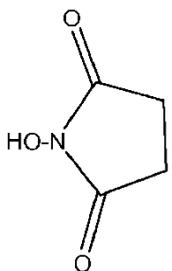


(6) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIa) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ib α).

5

Las bases y disolventes utilizados en las etapas suplementarias son tales como se han indicado anteriormente.

La N-hidroxisuccinimida, de fórmula



10

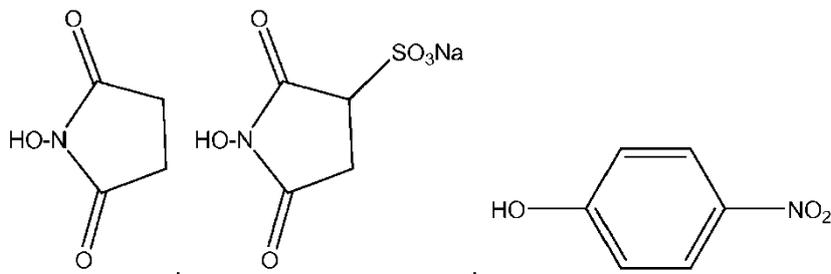
que, cuando pierde su hidrógeno a nivel del grupo hidroxilo, se vuelve un grupo activado Y, permite la activación en grupo activado del grupo listo para ser activado Y = -OH del compuesto de fórmula (Ia), en presencia de un derivado de carbodiimida. Este último puede ser, por ejemplo la dicitohexilcarbodiimida o la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

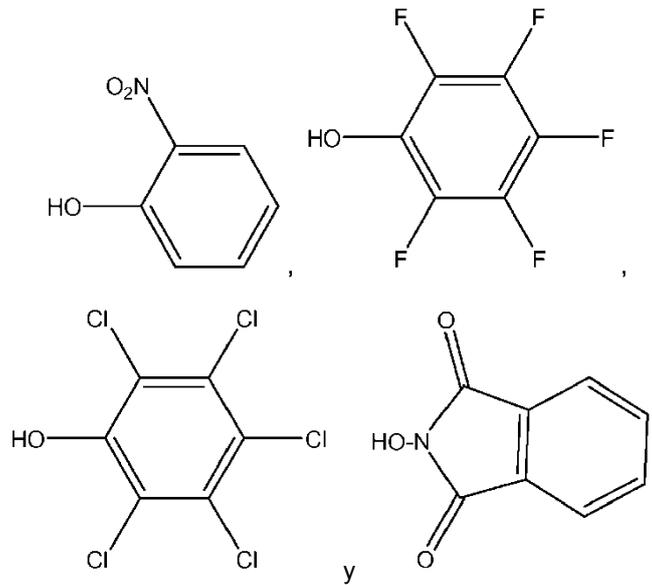
15

Los alquilo y los arilo son unos grupos conocidos por el experto en la materia. A título no limitativo de grupo alquilo, se pueden citar el metilo, el etilo, el propilo, el isopropilo, el butilo, el t-butilo, el pentilo. A título no limitativo de grupo arilo, se pueden citar el fenilo, el bencilo, el toloilo, el xililo, el bencilideno, el benzoilo y el naftilo.

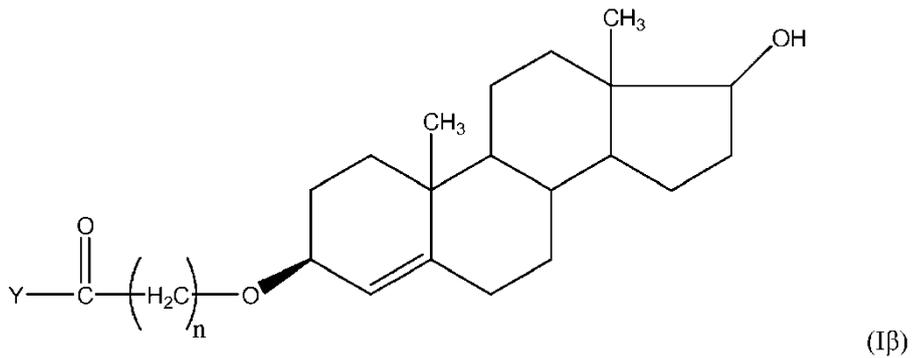
20

Cuando Y representa uno de los grupos siguientes:

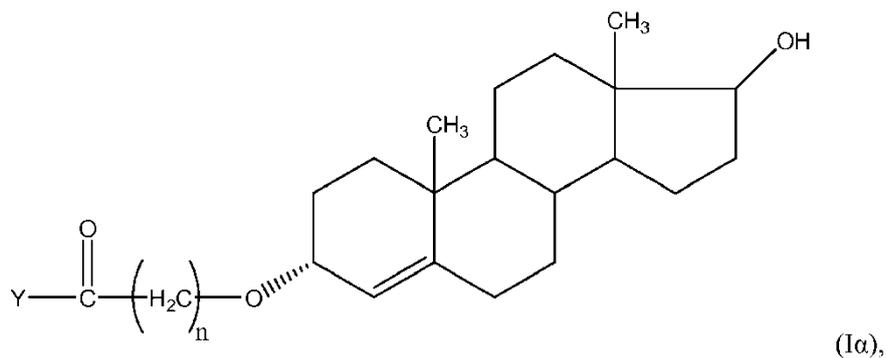




5 los derivados de testosterona son entonces unos compuestos de fórmula (I β) o (I α) siguientes según que sean respectivamente unos isómeros β o α en la posición 3:



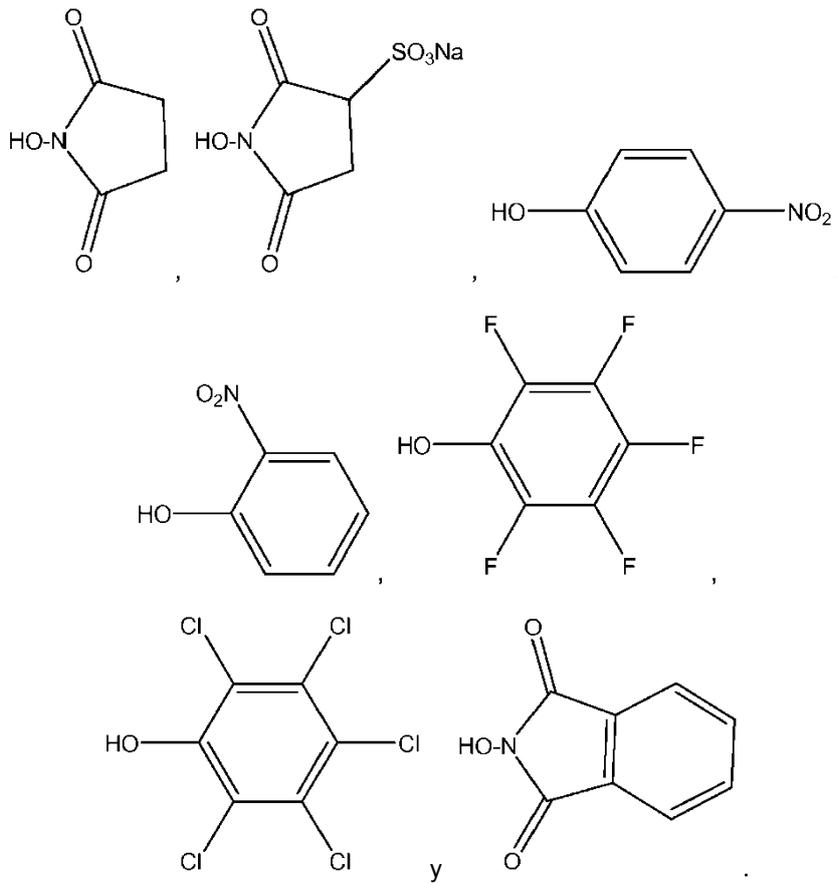
10 Y



15 siendo n tal como se ha definido anteriormente, los procedimientos de preparación comprenden las etapas anteriores (1) y (2) para los isómeros β y (1) a (3) para los isómeros α , así como la etapa siguiente:

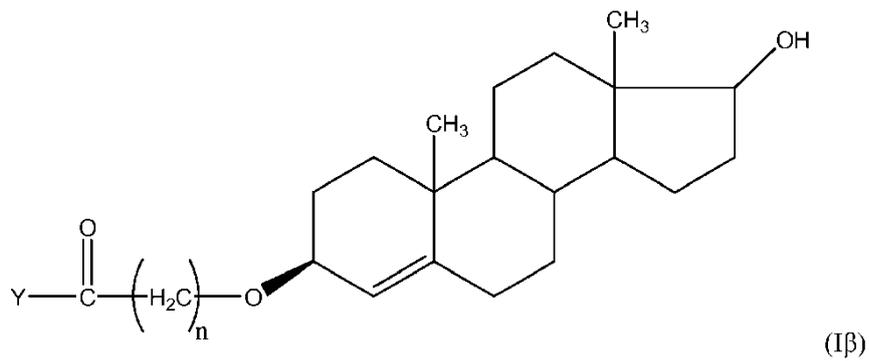
1. poner a reaccionar el compuesto de fórmula (I β) o (I α) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener los compuestos de fórmula (I β) o (I α):

20

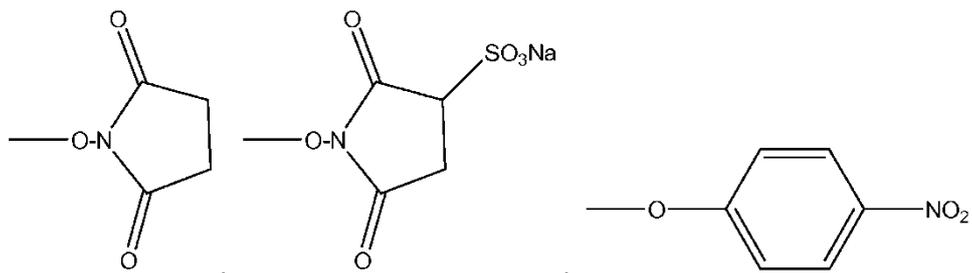


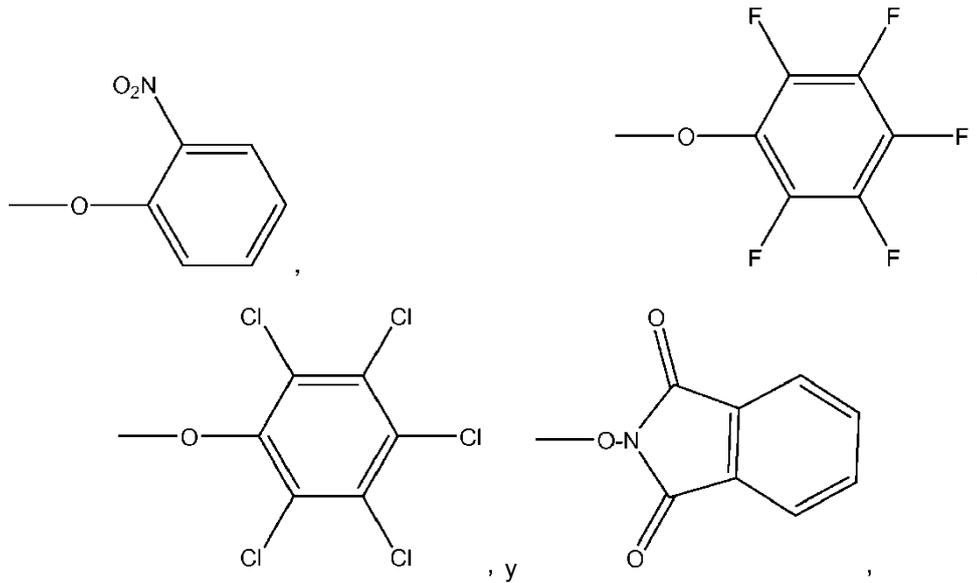
Otra vez, la activación del grupo listo para ser activado del compuesto (Ia), Y= - OH, se realiza utilizando, en presencia de un derivado de carbodiimida, uno de los siete compuestos anteriores apropiados que, cuando pierden el hidrógeno del grupo hidroxilo, se vuelve unos grupos activados Y.

10 Así, otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (I β) siguiente:



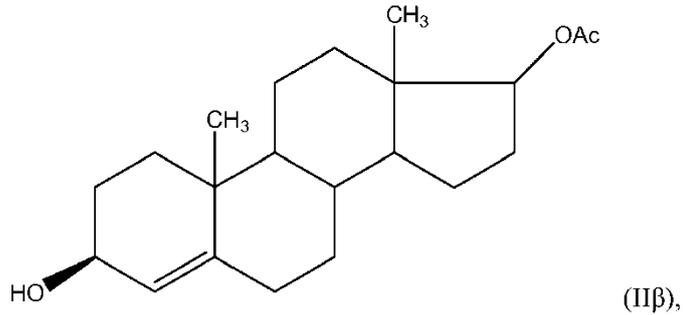
en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa:





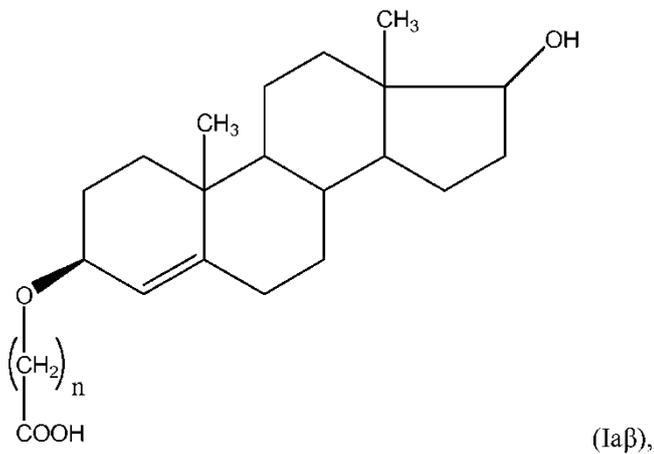
5 que comprende o que consiste en las etapas que consisten en:

10 (1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (IIβ):



15 en la que Ac significa -CO-CH₃,

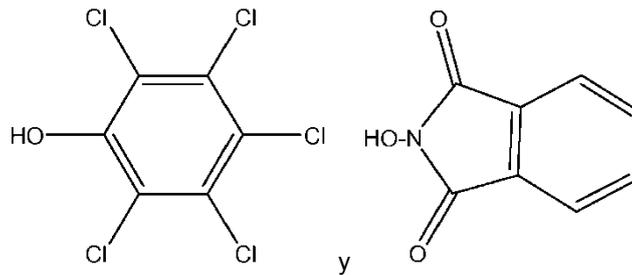
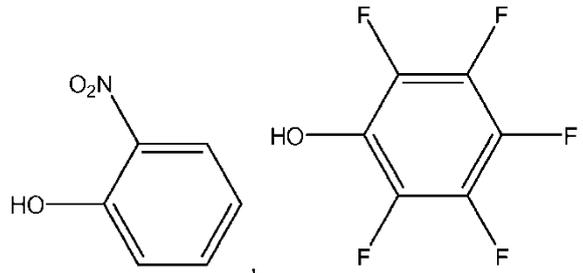
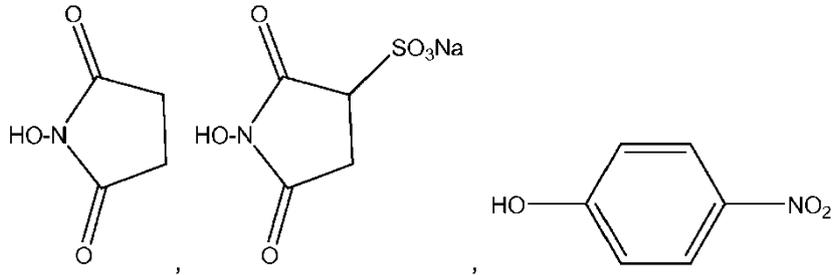
(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IIβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaβ):



20

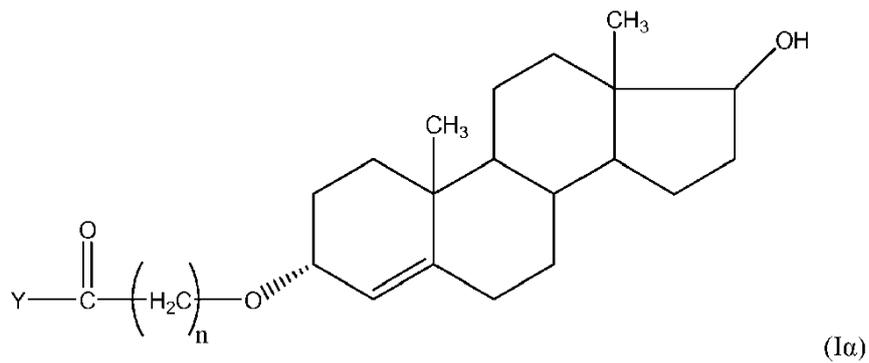
(3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (I β) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener los compuestos de fórmula (I β):

5



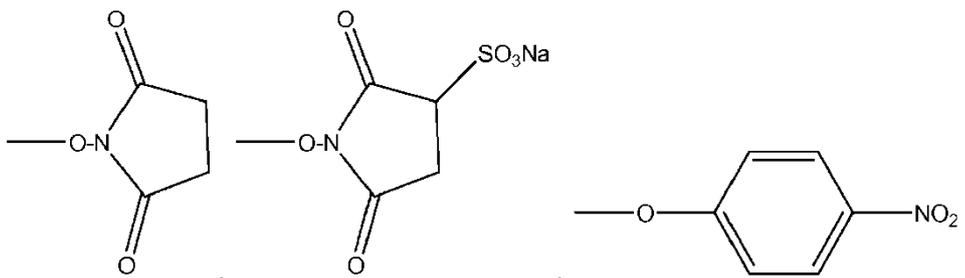
10

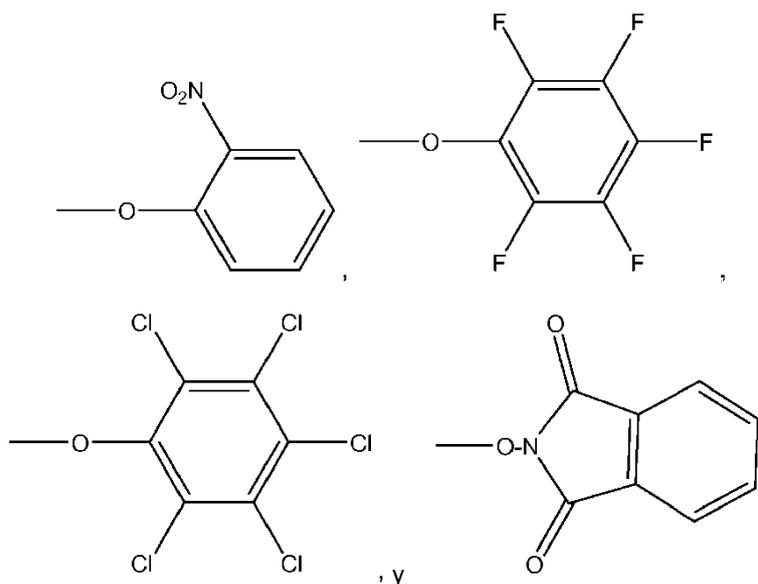
También otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (I α) siguiente:



15

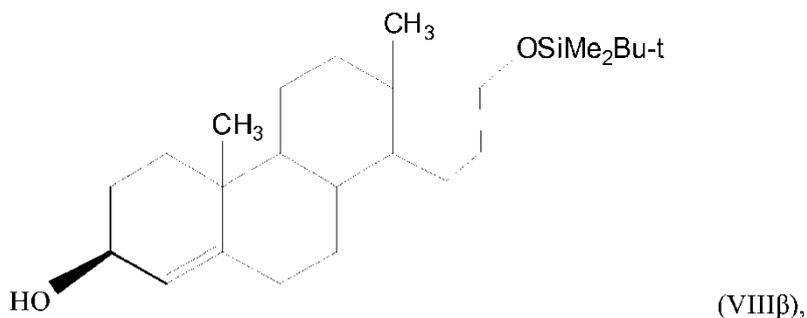
en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa:





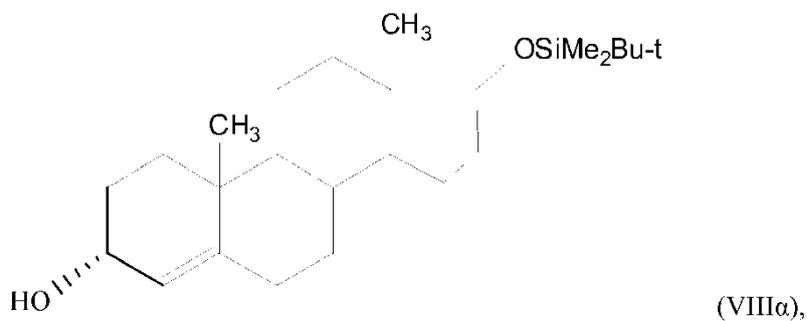
5 que comprende o que consiste en las etapas que consisten en:

10 (1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIIIβ):



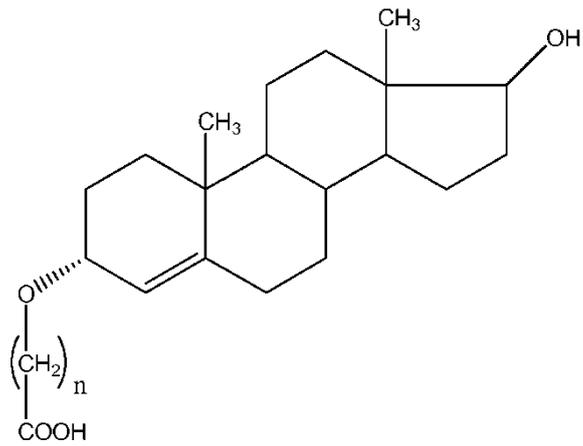
15 en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIβ) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIIIα):

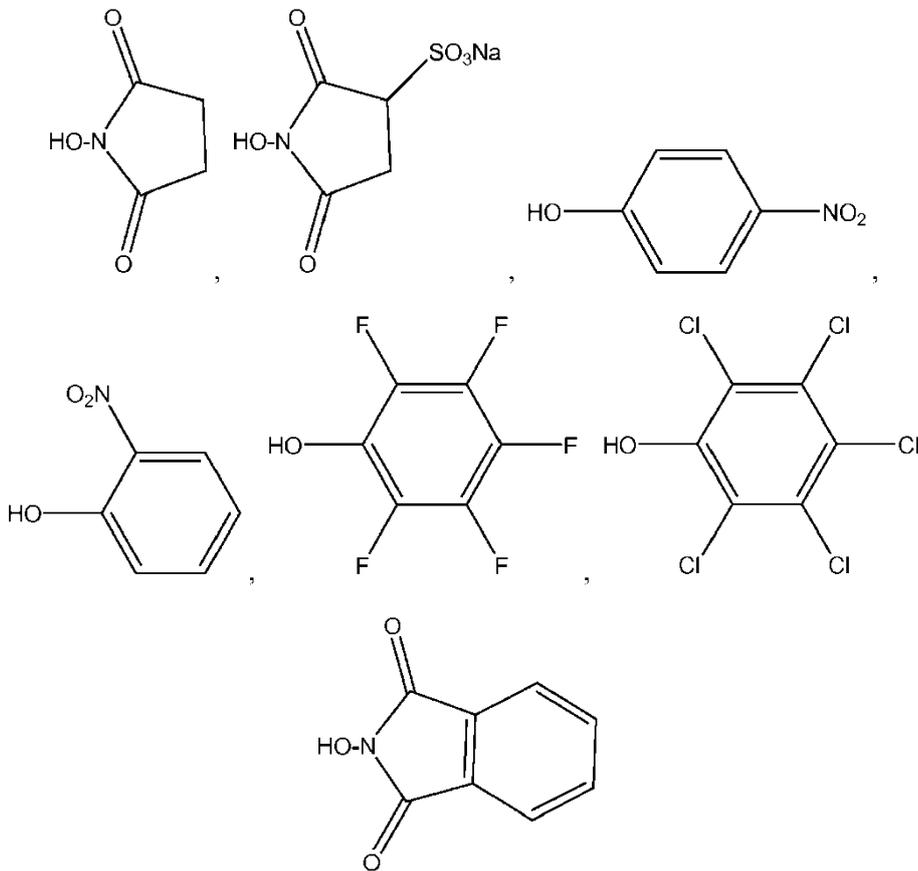


20 en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

25 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIα) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaα):

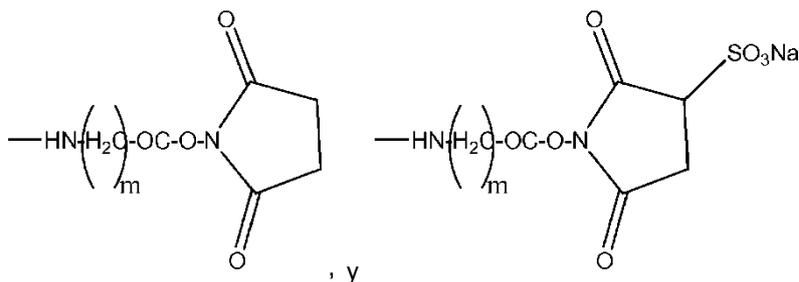


5 (4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaα) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener un compuesto de fórmula (Ia):



10 y

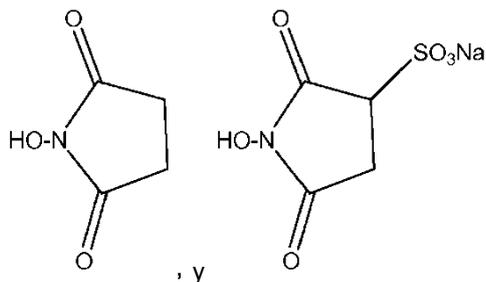
Cuando Y representa:



15

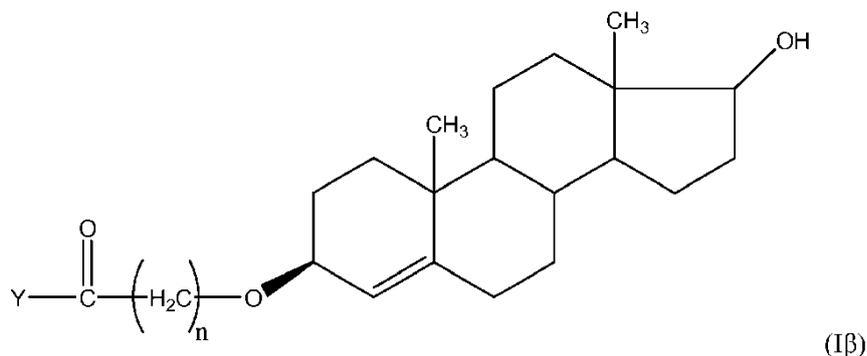
siendo m un número entero tal como se ha definido anteriormente, los derivados de testosterona son entonces unos compuestos de fórmula (I β) o (I α) dependiendo de si son, respectivamente, unos isómeros β o α en la posición 3, los procedimientos de preparación comprenden las etapas anteriores (1) y (2) para los isómeros β y (1) a (3) para los isómeros α , así como las etapas (3) a (5) para los isómeros β y (4) a (6) para los isómeros α para la preparación de los compuestos de fórmula (I β) o (I α), así como la etapa siguiente:

1. poner a reaccionar el compuesto de fórmula (I β) o (I α) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener un compuesto de fórmula (I β) o (I α):

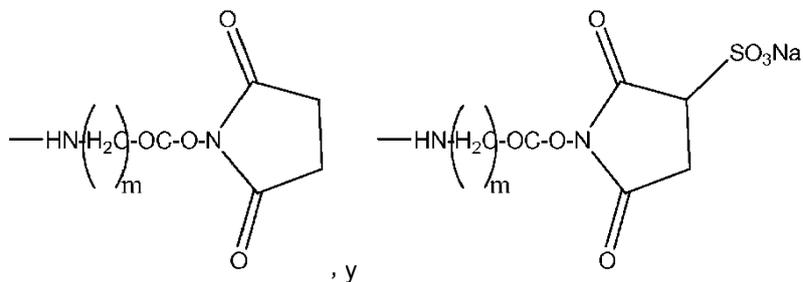


Otra vez, la activación del grupo listo para ser activado del compuesto (Ib), Y= - COOH, se realiza utilizando, en presencia de un derivado de carbodiimida, uno de los dos compuestos anteriores que, cuando pierden el hidrógeno del grupo hidroxilo, se vuelven unos grupos activados Y.

Así, otro objeto de la invención consiste en un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (I β) siguiente:

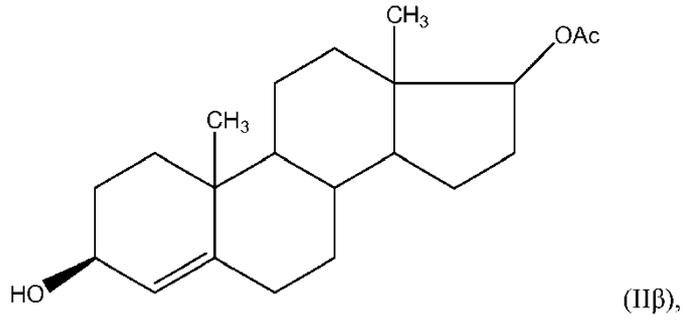


en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa:



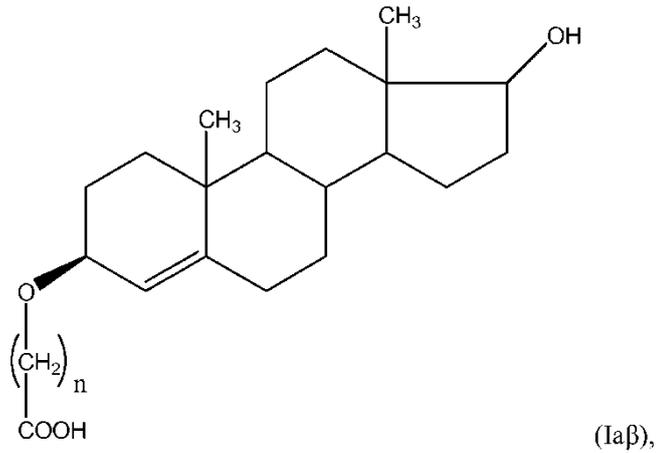
siendo m un número entero comprendido entre 1 y 10, el procedimiento que comprende o que consiste en las etapas que consisten en:

(1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (II β):

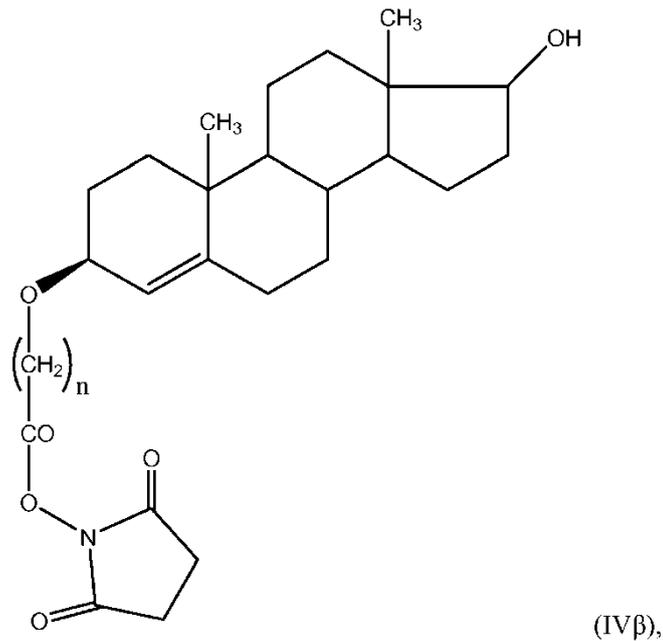


en la que Ac significa -CO-CH₃,

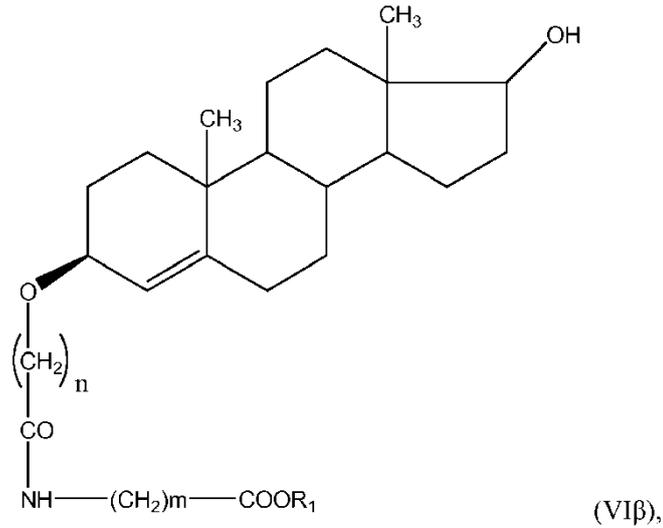
- 5 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IIβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaβ):



- 10 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaβ) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IVβ):

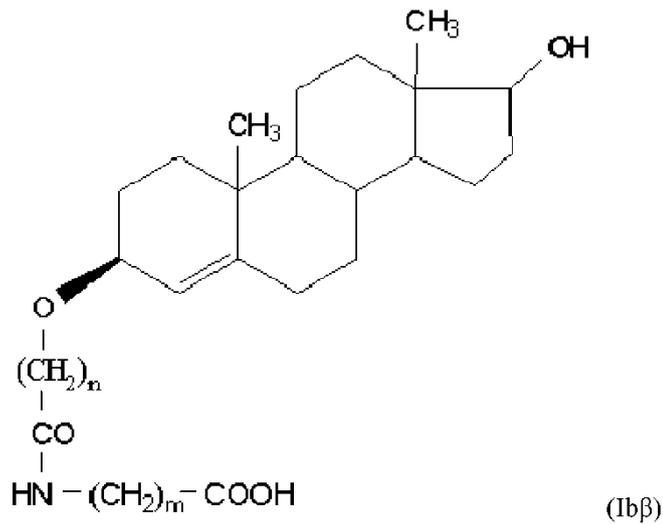


- 15 (4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IVβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): H₂N-(CH₂)_m-COOR₁, en la que R₁ es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VIβ):



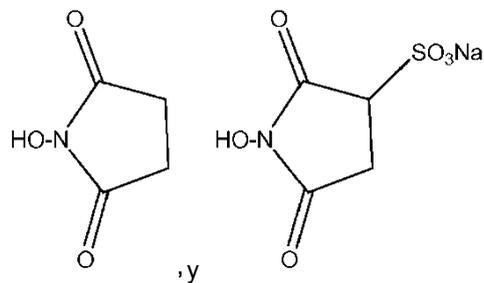
(5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIβ) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ibβ):

5



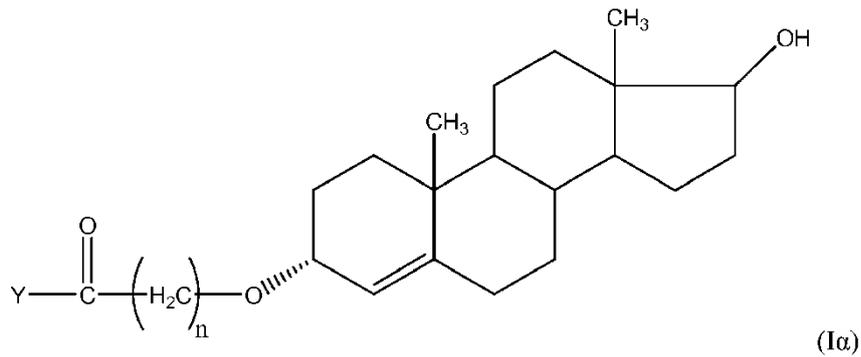
(6) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ibβ) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener los compuestos de fórmula (Iβ):

10

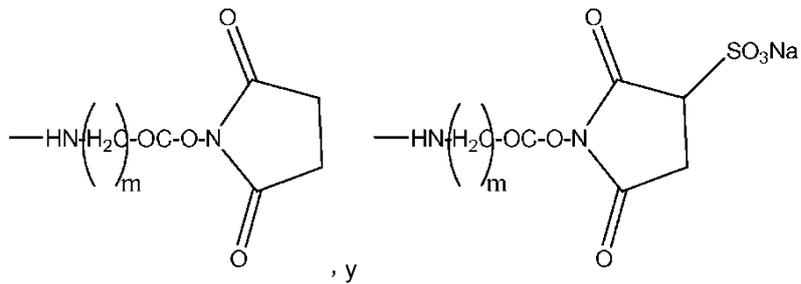


También otro objeto de la invención consiste en un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (Iα) siguiente:

15

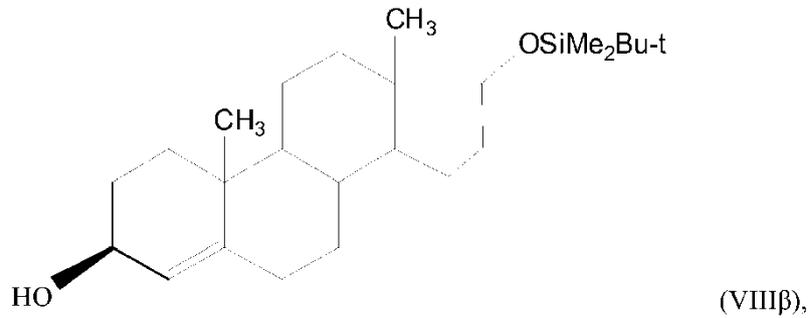


en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa:



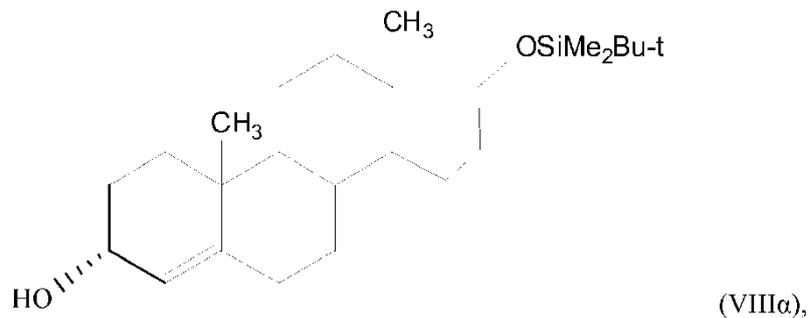
siendo m un número entero comprendido entre 1 y 10, el procedimiento que comprende o que consiste en las etapas que consisten en:

(1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIII β):



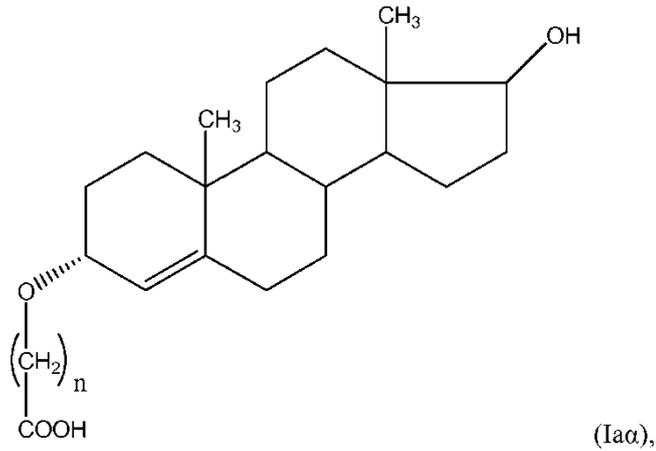
en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII β) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIII α):

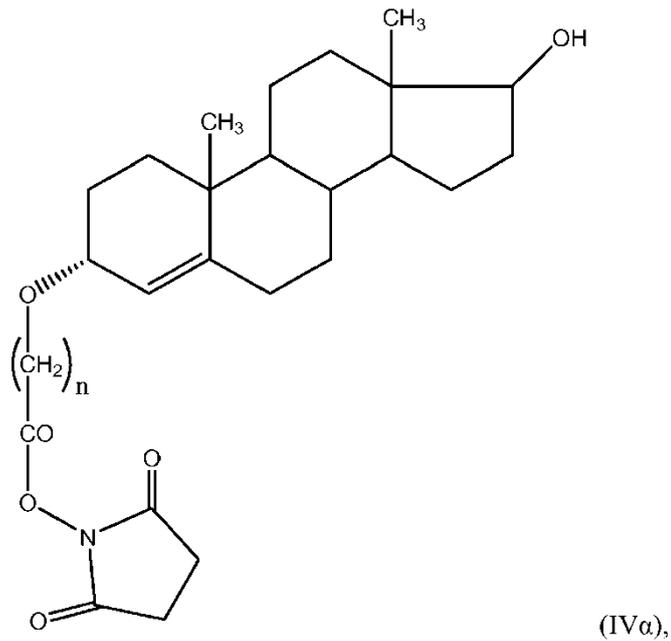


en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

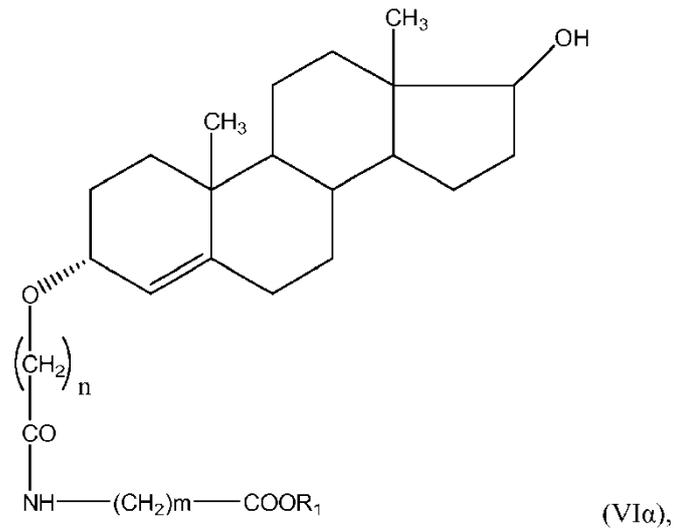
- 5 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII α) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ia α):



- 10 (4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ia α) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IV α):

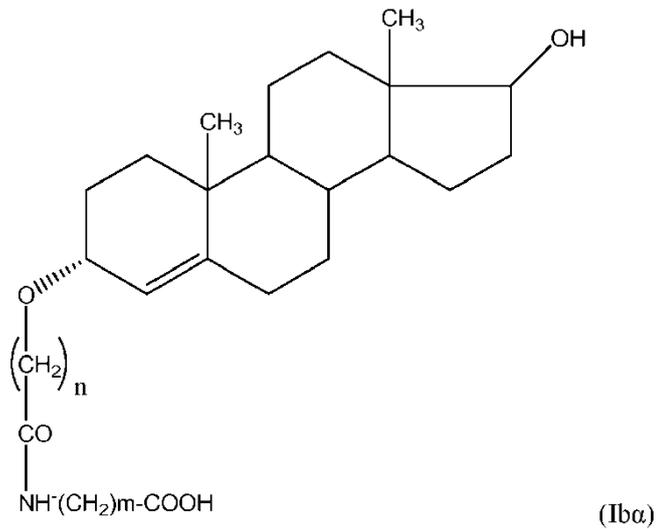


- 15 (5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IV α) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): H₂N-(CH₂)_m-COOR₁, en la que R₁ es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VI α):



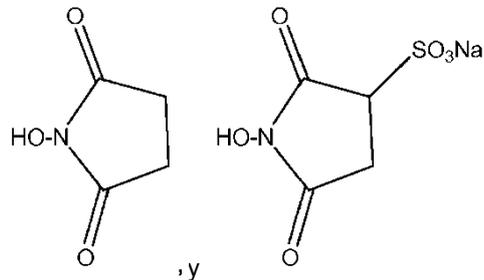
(6) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIα) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ibα):

5



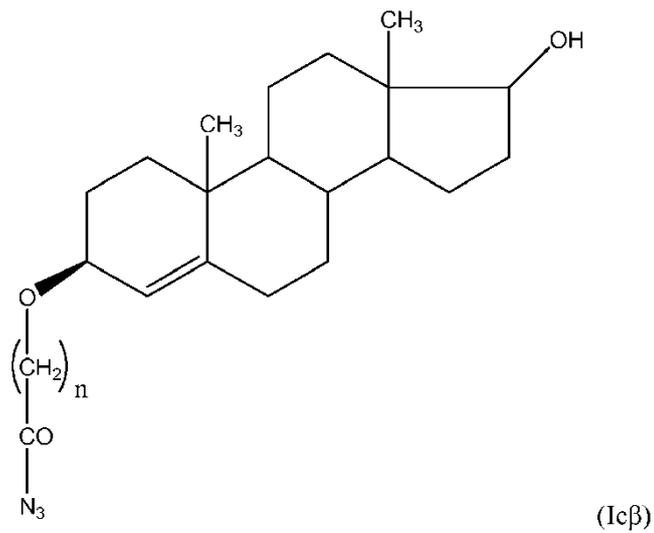
(7) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ibα) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener un compuesto de fórmula (Iα):

10

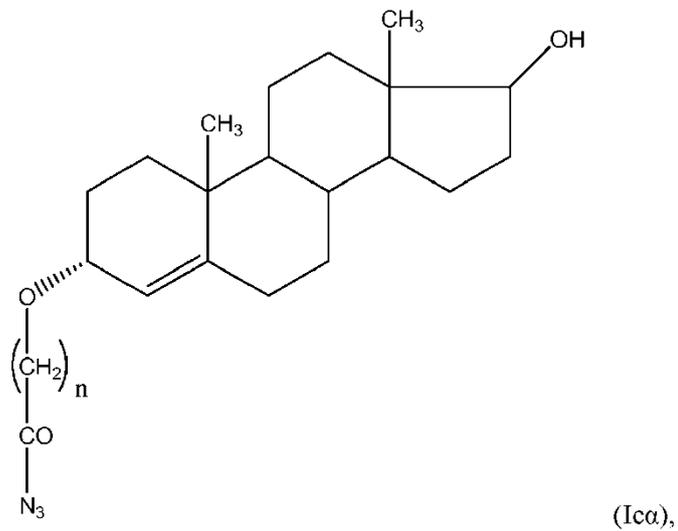


Finalmente, cuando Y representa N₃, los derivados de testosterona son entonces unos compuestos de fórmula (Icβ) o (Icα) siguientes según que sean respectivamente unos isómeros β o α en la posición 3:

15



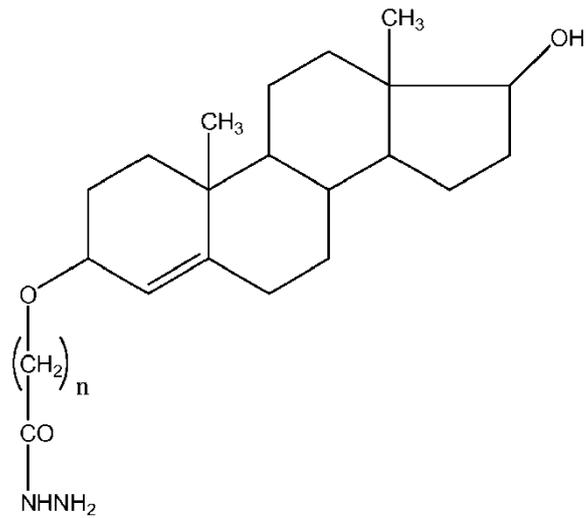
y



5

siendo n tal como se ha definido anteriormente, el procedimiento de preparación comprende las etapas anteriores (1) y (2) para los isómeros β y (1) a (3) para los isómeros α , así como las dos etapas siguientes:

- 10 (1) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ia β) o (Ia α) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con H_2NNH_2 , para obtener el compuesto de fórmula (VII):



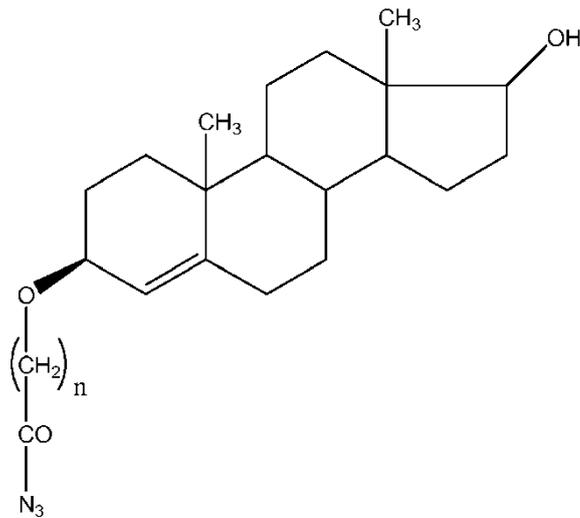
(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VII) así obtenido con HONO para obtener el compuesto de fórmula (Ic β) o (Ic α).

5

El derivado de carbodiimida utilizado en este procedimiento es tal como se ha definido anteriormente.

Así, otro objeto de la invención consiste en un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (Ic β) siguiente:

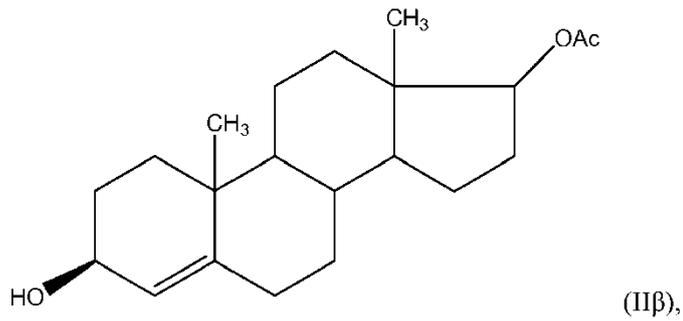
10



en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, el procedimiento que comprende o que consiste en las etapas que consisten en:

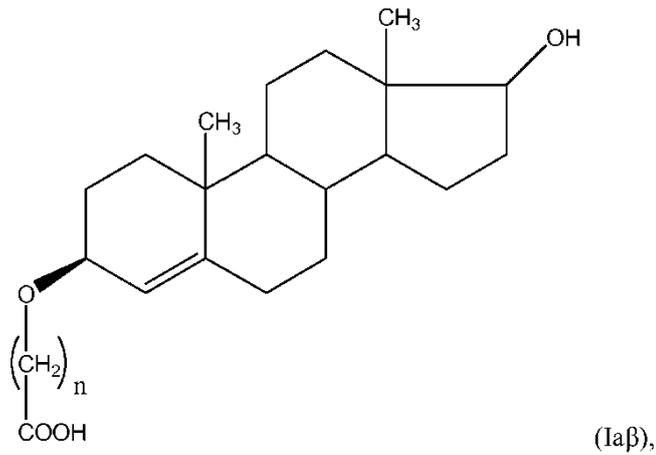
15

(1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (II β):

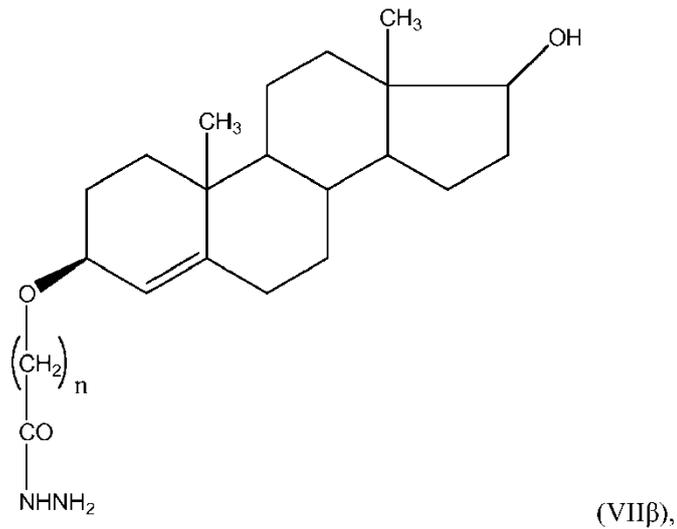


en la que Ac significa -CO-CH₃,

- 5 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IIβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaβ):

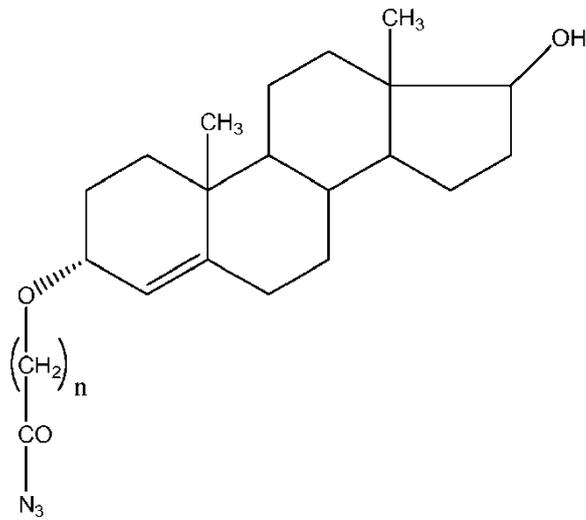


- 10 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaβ) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con H₂NNH₂, para obtener el compuesto de fórmula (VIIβ):



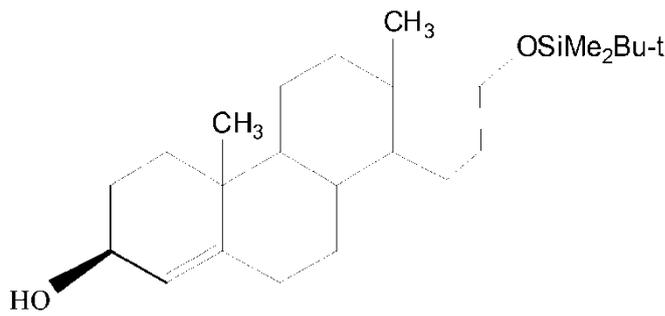
- 15 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIβ) así obtenido con HONO para obtener el compuesto de fórmula (Icβ).

20 Un último objeto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (Icα) siguiente:



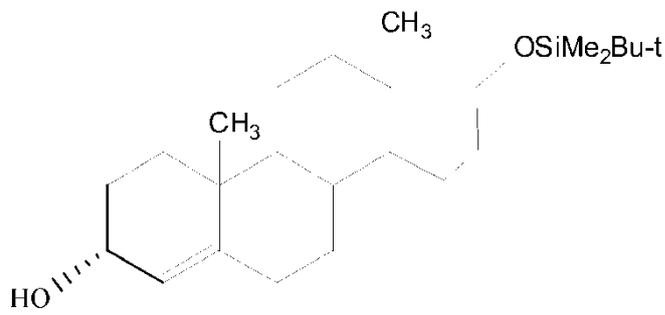
en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, el procedimiento que comprende o que consiste en las etapas que consisten en:

- 5 (1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIIIβ):



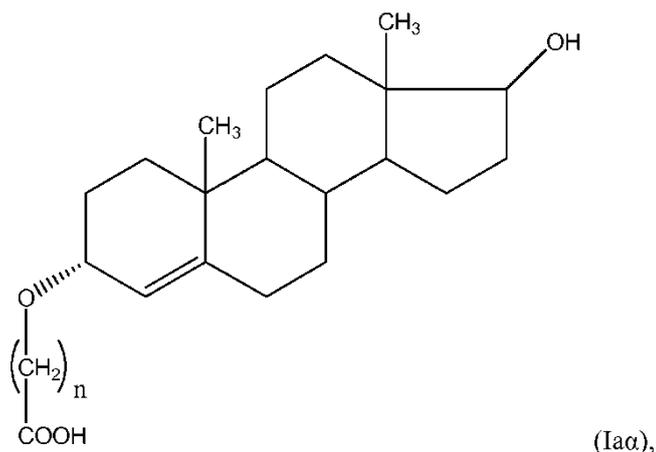
en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

- 15 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIβ) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIIIα):



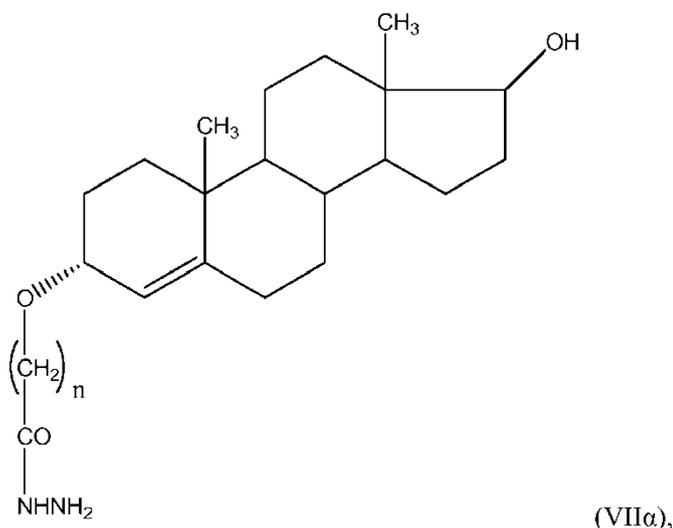
en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

- 25 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIα) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iα):



(4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaα) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con H_2NNH_2 , para obtener el compuesto de fórmula (VIIα):

5



(4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIα) así obtenido con $HONO$ para obtener el compuesto de fórmula (Icα).

10

La preparación de los conjugados de la invención se realiza mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia que permite formar un enlace de amida entre los compuestos de fórmula (I) y una amina primaria en otra molécula, tal como se describe en particular en Wong S.S., 1991.

15

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes dados a título ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las figuras, en las que:

20

- la figura 1 muestra un gráfico que da la relación B/B0 en % en función de la concentración de los puntos de la gama patrón (escala logarítmica), para un análisis de referencia (REF), utilizando un conjugado de la técnica anterior, un 2ª determinación utilizando un conjugado de la técnica anterior (Ab1 + conjugado VIDAS®) y dos determinaciones utilizando un derivado de testosterona de la invención (ab2 + conjugado 1 de la invención, y Ab3 + conjugado 1 de la invención),

25

- la figura 2 muestra un gráfico que da la relación B/B0 en % en función de la concentración de los puntos de la gama patrón (escala logarítmica) para una determinación que utiliza Ab2 + conjugado 1 de la invención y una determinación que utiliza Ab3 + conjugado 2 de la invención.

Ejemplos

30

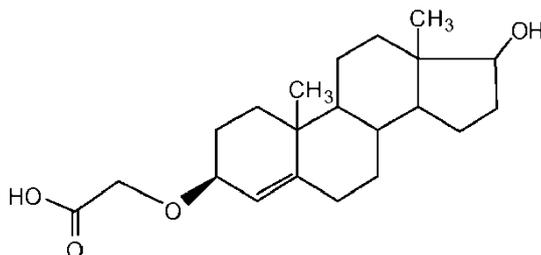
El análisis y el control de la reacción en cromatografía sobre capa fina (CCM) se efectúan sobre la placa de gel de sílice Merck (tipo 60, F254, grosor de 0,2 mm) visualizados con la ayuda de una lámpara UV a 254 nm y revelados con calor después de la pulverización del ácido fosfomolibdico al 5% en etanol (95%). La purificación de los

productos se realiza por "cromatografía ultrarrápida" sobre gel de sílice Merck, 40-63 μm , pH 6,5 a 7,5-

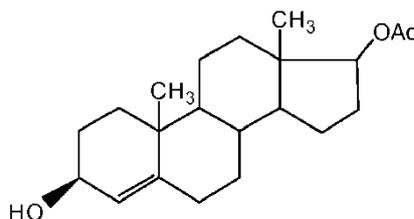
Los espectros RMN son registrados en el aparato Bruker Avance 250. Los desplazamientos químicos δ son expresados en ppm a partir de las referencias: cloroformo deuteriado CDCl_3 , $\delta = 7,26$ ppm para ^1H y 77,14 ppm para ^{13}C ; metanol deuteriado CD_3OD , $\delta = 4,90$ ppm para ^1H y 49,0 para ^{13}C ; tetrametilsilano (TMS): $\delta = 0$ ppm para ^1H y ^{13}C . Los espectros IR son registrados en el aparato Thermo-Nicolet FT-IR Avatar 360 y se utiliza la opción Golden Gate. Los análisis en LC-MS se efectúan con el sistema LC-MS PE-Sciex API 100, columna C_4 .

Ejemplo 1: Preparación de un derivado de testosterona de la invención de fórmula (Ia β)

17 β -hidroxi-3 β -carboximetoxiandro-4-eno o compuesto de fórmula (I β) en la que n=1 y Y=-OH



1.1 Preparación de 3 β -Hidroxi-17 β -acetoxi-4-androsteno (II β)



Una solución de 4,23g (14,7 mmoles) de testosterona en 8 ml de piridina que se ha secado sobre hidróxido de potasio (KOH) durante 1 noche (5 g de KOH para 250 ml de piridina) se prepara en un matraz de 250 ml provisto de una agitación magnética. La solución se enfría hasta 0°C con una mezcla agua/hielo. Se añaden gota a gota 4 ml de anhídrido acético. Se deja volver el medio de reacción hasta temperatura ambiente. Se agita la solución durante una noche a temperatura ambiente. No se encuentra más el producto de partida sobre la CCM analítica (eluyente: acetato de etilo / éter de petróleo, 3/1, v/v). Se vierten 30 ml de agua destilada y 30 ml de acetato de etilo en el matraz y la mezcla se agita. Las fases se separan con una ampolla para decantar y la fase acuosa se extrae con 3x20ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas se reúnen y la solución obtenida se lava con 20 ml de agua destilada, se seca sobre sulfato de magnesio (MgSO_4) anhidro y se evapora en el evaporador rotativo. El producto así obtenido se seca bajo presión reducida con la ayuda de una bomba al vacío durante 4 horas para quitar todos los disolventes. Se obtienen 4,8 g (rendimiento = 99,0%) del producto intermedio 17 β -acetoxi-4-androsteno.

$^1\text{HRMN}(\text{CDCl}_3)$: δ 5,70(1H, H₄), 4,60(1H, H₁₇), 2,07(3H, s), 1,16(3H, s), 0,80(3H, s). $^{13}\text{CRMN}(\text{CDCl}_3)$: δ 199,5, 171,0(2C), 123,9, 82,5, 53,7, 50,2, 42,4, 38,6, 36,6, 35,7, 35,4, 33,9,32,8, 31,5, 27,5, 23,5, 21,2, 20,5, 17,4, 12,1.

En un matraz de 250 ml provisto de una agitación magnética, se disuelven 4,7 g (14,2 mmoles) de 17 β -Acetoxi-4-androsteno en 20 ml de metanol y 3 ml de tetrahidrofurano (THF). La solución se enfría después hasta 0°C con una mezcla agua/hielo. Se añade 0,8 g (21,1 mmoles) de borohidruro de sodio (NaBH_4) en la solución. La reacción se sigue sobre placa CCM (eluyente: acetato de etilo/éter de petróleo, 1/1, v/v) controlando la desaparición del producto de partida. Una vez que todo el producto de partida se ha consumido, se añaden 10 ml de acetona para detener la reacción. Se deja volver la solución a temperatura ambiente y la solución se evapora en el evaporador a 30°C. Se vierten 30 ml de agua destilada y 30 ml de acetato de etilo en el matraz. La mezcla se agita y las fases se decantan. La fase acuosa se extrae con 3x30 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas se reúnen, lavadas con 30 ml de agua destilada, secadas sobre MgSO_4 anhidro y finalmente evaporadas en seco bajo presión reducida a 30°C. Se obtienen 4,6 g (rendimiento = 97,3%) del producto (II β) después de una purificación cromatográfica sobre gel de sílice (eluyente: acetato de etilo / éter de petróleo, 111, v/v).

$^1\text{HRMN}(\text{CDCl}_3)$: δ 5,30(1H, H₄), 4,61(1H, t, H₁₇), 4,18(1H, H₃), 2,04(3H, s), 1,05(3H, s), 0,80(3H, s). $^{13}\text{CRMN}(\text{CDCl}_3)$: δ 171,3, 147,3, 123,7, 82,8, 67,9, 54,4, 50,5, 42,6, 37,4, 36,8, 35,8, 35,5, 32,6, 32,1, 29,5, 27,5, 23,6, 21,3, 20,6, 19,0, 12,1.

1.2 Preparación del derivado de testosterona de la invención de fórmula (Ia β)

El disolvente seco de reacción diclorometano (CH_2Cl_2) se prepara por destilación de 250 ml de CH_2Cl_2 sobre 5 g del pentóxido de fósforo (P_2O_5).

5 Un matraz de tres bocas de 250 ml provisto de una agitación magnética, de una ampolla de vertido y de una llegada de gas inerte se purga con nitrógeno seco durante 10 min. Se introducen bajo nitrógeno 2,2 g (6,6 mmoles) de 3 β -Hidroxi-17 β -acetoxi-4-androsteno (II β), 10 ml de diclorometano seco y 20 mg (0,045 mmoles) de acetato de Rodio(II) dímero $[\text{Rh}(\text{OAc})_2]_2$. La mezcla obtenida se enfría hasta 0°C. Una solución de 2,5 ml (2,71g, 23,8 mmoles) de diazoacetato de etilo ($\text{N}_2\text{CHCOOEt}$) en 5 ml de diclorometano seco se prepara y se introduce en la ampolla de vertido. La solución se añade en el matraz de tres bocas bajo nitrógeno, bajo agitación, durante 70 min. Se deja volver el medio de reacción hasta temperatura ambiente y se mantiene la agitación durante 4 horas. Sobre la CCM (eluyente: acetato de etilo / éter de petróleo, 1/1, v/v), se puede encontrar todavía la presencia del producto de partida en baja cantidad. A fin de totalizar la reacción, se añaden 2,5 mg (0,006 mmoles) de $[\text{Rh}(\text{OAc})_2]_2$. Una solución de 0,5 ml (4,8 mmoles) de N_2CHCOO y en 2 ml de diclorometano seco se introduce en el matraz de tres bocas mediante la ampolla de vertido durante 10 min a temperatura ambiente. Se vierten 20 ml de agua destilada y 20 ml de diclorometano y la mezcla se agita durante 10 min. Las fases se separan y la fase acuosa se extrae con 2x20 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se reúnen, secadas sobre MgSO_4 anhidro y evaporadas en seco con la ayuda de un evaporador rotativo a 25°C para dar el producto bruto en forma de aceite amarillo. La purificación se realiza en cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: acetato de etilo / éter de petróleo, 1/3, v/v). Se obtienen 2,4 g (rendimiento = 86,6%) del producto 3 β -Carboximetoxi-17 β -acetoxi-4-androsteno etiléster.

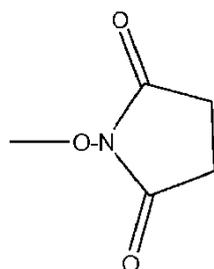
¹HRMN (CDCl_3): δ 55,39(1H), 4,54(1H, t), 4,23(2H, q), 4,13(1H), 2,03(s), 1,29(t), 1,05(s), 0,80(s). ¹³CRMN(CDCl_3): δ 171,2, 170,9, 148,1, 120,4, 82,7, 76,0, 65,5, 61,2, 54,3, 50,4, 42,5, 37,5, 36,8, 35,6, 35,2, 32,5, 32,1, 27,5, 25,2, 23,5, 21,2, 20,4, 18,8, 14,0, 12,0. MS (LC-MS): 347,0 (M-H)⁻.

25 Se introducen 2,0 g (4,8 mmoles) de 3 β -Carboximetoxi-17 β -acetoxi-4-androsteno etiléster y 20 ml de metanol en un matraz de 250 ml provisto de una agitación magnética. La mezcla se enfría hasta 0°C. Se añaden 10 ml (1,0M, 10 mmoles) de solución de hidróxido de sodio (NaOH). Se mantiene la agitación a 0°C durante 3 horas. Se deja volver el medio de reacción hasta temperatura ambiente y la reacción de saponificación se completa después de 20 horas de agitación. La mezcla de reacción se neutraliza con ácido clorhídrico (HCl, 1,0N) a pH 6 y después se evapora a 25°C con un evaporador rotativo. El residuo se purifica sobre una columna de gel de sílice para dar 1,3 g (rendimiento = 78,0%) del producto (I β).

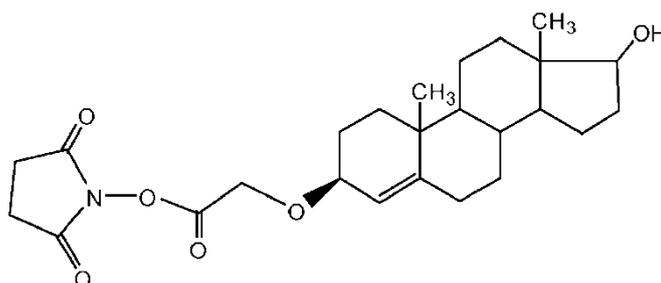
35 ¹HRMN (CD_3OD): δ 5,32(1H, H₄), 3,83(2H), 3,50(1H, t), de 2,40 a 1,10 (m), 1,01(3H, s), 0,69(3H, s). ¹³CRMN(CD_3OD): δ 174,5, 148,9, 119,8, 81,9, 76,3, 64,8, 54,5, 50,7, 42,9, 37,6, 36,6, 35,9, 35,2, 32,6, 32,2, 30,3, 25,2, 23,4, 20,6, 18,9, 11,1. IR (cm^{-1}): 3383, 2928, 2869, 2847, 1721, 1529, 1432, 1377, 1336, 1243, 1213, 1110, 1050.

40 Ejemplo 2: Preparación de un derivado de testosterona de la invención de fórmula (I β)

17 β -hidroxi-3 β -carboximetoxi-androst-4-eno N-hidroxisuccinimida éster o compuesto de fórmula (I) en la que n=1 y Y=



45



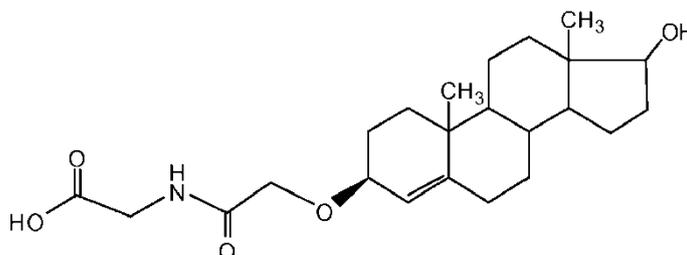
Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 1, después se prosigue de la siguiente manera.

Se introducen 10 ml de 1,2-dimetoxietano (DME) destilado sobre hidruro de calcio (CaH₂), 100 mg (0,287 mmoles) del compuesto de fórmula (Ia β) preparado en el ejemplo 1, y 33 mg (0,287 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (HOSu) en un matraz de 25 ml provisto de una agitación magnética. La mezcla se enfría a 0°C. Se añaden 59 mg (0,287 mmoles) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Se mantiene la agitación a temperatura durante 15 horas. Se encuentra, sobre la CCM (eluyente: cloroformo/acetona/ácido acético, 70/25/1, v/v/v), la desaparición casi total del producto de partida. La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se evapora a temperatura ambiente bajo presión reducida. Se añaden 6,0 ml de diclorometano anhidro en el residuo y la mezcla así obtenida se filtra después. La solución se evapora en seco a temperatura ambiente con un evaporador rotativo. El producto se seca al vacío durante 4 horas. Se obtienen 64 mg (50,0%) del producto (IV β , n=1).

¹HRMN (CDCl₃): δ 5,38(1H, H₄), 4,47(2H), 4,40(1H, t, H₁₇), de 4,20 a 3,40(4H, m), 2,85(4H, s), de 2,60 a 1,10 (m), 1,05(3H, s), 0,74(3H, s). ¹³CRMN(CDCl₃): δ 168,9, 166,6, 149,2, 119,7, 81,9, 76,9, 63,2, 54,5, 50,7, 42,9, 37,6, 36,6, 36,0, 35,1, 32,6, 32,2, 30,5, 25,7, 25,2, 23,4, 20,6, 18,9, 11,2. IR (cm⁻¹): 3537, 3323, 2929, 2849, 1784, 1732, 1203, 1071. IR (cm⁻¹): 3536, 3507, 3322, 2928, 2849, 1783, 1731, 1624, 1573, 1442, 1426, 1376, 1203, 1071. MS (LC-MS): 446 (M + H)⁺, 908 (2M + H₂O)⁺.

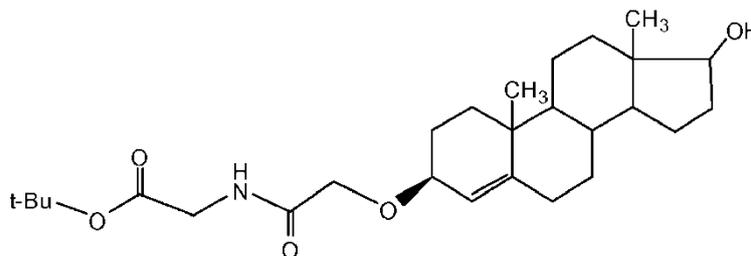
Ejemplo 3: Preparación de un derivado de testosterona de la invención de fórmula (Ib β)

Compuesto de fórmula (Ib β) en la que n=1 y Y=-NH-CH₂-COOH



Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 1, después se prosigue de la siguiente manera.

3.1 Preparación del compuesto de fórmula (VI β) en la que m = n = 1



El producto del ejemplo 1 (Ia β) (500 mg, 1,43 mmoles) y 30 ml de DME anhidro se introducen en un matraz de 100 ml. Se añade N-hidroxisuccinimida (HOSu, 247,7 mg, 2,15 mmoles). La mezcla se agita y se añade después 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 440 mg, 2,15 mmoles). Se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 1 noche. El medio de reacción se filtra y el filtrado, que contiene el compuesto (IV β , n=1) se utiliza directamente para la continuación de la síntesis.

Una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 1,0N, 10 ml) y 1,0 ml de producto terc-butilglicina éster (H₂NCH₂COOBu^t) se añaden en el filtrado. La mezcla formada se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Se mezclan 70 ml de agua destilada y 50 ml de acetato de etilo con el medio de reacción. Las fases se decantan y la fase se extrae con acetato de etilo (3x50 ml). La solución orgánica reunida se seca sobre MgSO₄ anhidro después se evapora con la ayuda de un evaporador rotativo a 30°C. El residuo se purifica en cromatografía (eluyente: acetato de etilo al 100%). Se forman 401 mg (rendimiento = 60,2%) del producto (VI β , m=n=1) en forma de cristales blancos.

¹HRMN (CDCl₃): δ 7,19(1H), 5,32(1H), 4,35(1H), 4,01(2H, s), 3,94(2H, d), 3,64(1H, t), de 2,30 a 0,80 (m), 1,45(s), 1,04(s), 0,73(s). ¹³CRMN(CDCl₃): δ 170,6, 168,8, 148,8, 120,0, 82,3, 81,8, 76,3, 67,0, 54,5, 50,7, 42,9, 41,4, 37,6, 36,6, 36,0, 35,1, 32,6, 32,2, 30,5, 28,1, 25,5, 23,4, 20,6, 18,9, 11,1.

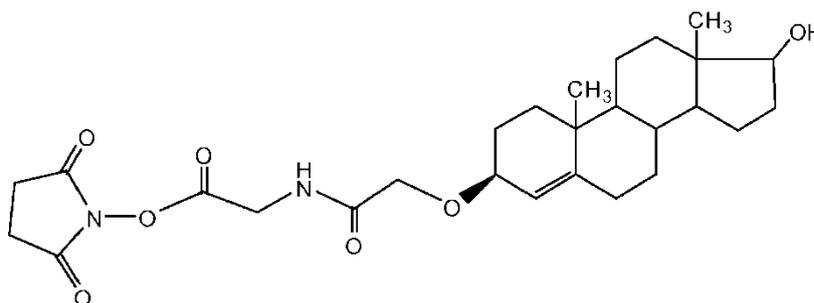
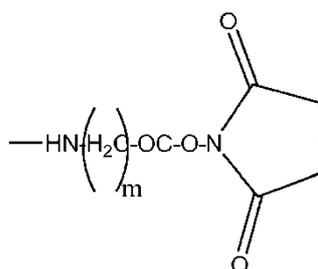
3.2 Preparación del derivado de testosterona de fórmula (Ib β) en la que m=n=1

Se disuelven 400 mg (0,87 mmoles) del éster de terc-butilo (VI β , n=1) preparado, en 30 ml de metanol. Se añaden 2,0 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH, 1,0N). Se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 15 horas. La mezcla de reacción se neutraliza con ácido clorhídrico (HCl, 1,0N) a pH = 6. La solución así formada se evapora a 30°C bajo presión reducida. El producto bruto obtenido se purifica en cromatografía con un eluyente metanol/cloroformo (20/80, v/v). Se obtienen 340 mg (rendimiento = 96,8%) del derivado de fórmula (I β , m=n=1) en forma de cristales blancos.

¹HRMN (CD₃OD): δ 5,35(1H), 3,96(2H, s), 3,86(2H, s), 3,50(1H, t), 3,25 (1H), de 2,30 a 0,70 (m), 1,02(3H, s), 0,69(3H, s). ¹³CRMN(CD₃OD): δ 173,5, 173,4, 149,5, 121,5, 82,3, 77,5, 67,7, 56,1, 52,0, 44,0, 42,0, 38,6, 37,9, 37,3, 36,4, 34,7, 33,9, 33,2, 30,5, 24,3, 21,7, 19,3, 11,6. IR (cm⁻¹): 3371, 3322, 2922, 2848, 1714, 1622, 1537, 1437, 1420, 1230, 1077. MS (LC-MS): 406,6 (M + H)⁺, 405,4 (M - H)⁻.

Ejemplo 4: Preparación de un derivado de testosterona de la invención de fórmula (I β)

Compuesto I β de fórmula (I) en la que m = n = 1 y Y=

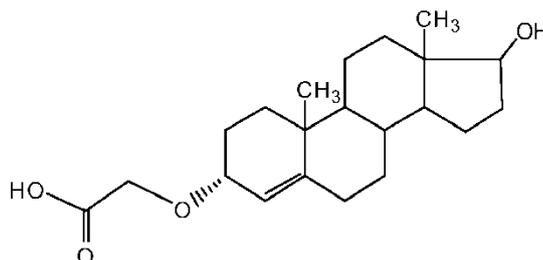


Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 3, después se prosigue de la siguiente manera.

El producto de fórmula (I β) obtenido en el ejemplo 3 (220 mg, 0,54 mmoles) se disuelve en 15 ml de tetrahidrofurano (THF) anhidro en un matraz provisto de una agitación magnética. Se introducen 62,5 mg (0,54 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (HOSu) y se forma una solución transparente. Se añaden 112 mg (0,54 mmoles) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). El medio se agita a temperatura ambiente durante 4 horas 30 min. La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se evapora sin calentar con la ayuda de un evaporador rotativo. El residuo obtenido se lava con 6,0 ml de diclorometano anhidro, después se seca al vacío. Se producen 190 mg (rendimiento = 70,1 %) del éster (I β). ¹HRMN (CDCl₃): δ 7,20(1H), 5,35(1H), 4,45(H, d), 4,05(2H), 3,98(1H), 3,64(1H, t), 2,84(4H, m), de 2,60 a 0,80 (m), 1,04(3H, s), 0,73(3H, s). ¹³CRMN(CDCl₃): δ 171,0, 168,7, 165,6, 149,1, 119,8, 81,8, 76,5, 66,8, 54,5, 50,7, 42,9, 38,3, 37,6, 36,6, 36,0, 35,0, 33,8, 32,6, 32,3, 30,4, 25,6, 23,4, 20,6, 18,9, 11,1. MS (Fab, Na): 501 (M - 1)⁺, 525 (M + Na)⁺.

Ejemplo 5: Preparación de un derivado de testosterona de la invención de fórmula (I α)

17 β -hidroxi-3 α -carboximetoxi-androst-4-eno o compuesto de fórmula (I α) en la que n=1 y Y=OH

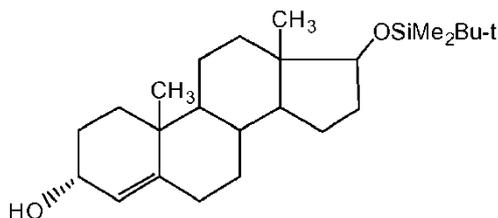


5.1 Preparación de 3 β -Hidroxi-17 β -O-(t-butildimetilsilil)-4-androsteno (VIII β)

5 Se introducen 2,88 g (10 mmoles) de testosterona, 12 ml de N,N'-dimetilformamida (DMF) anhidro y 1,0 g (14,7 mmoles) de imidazol en un matraz de 250 ml bajo nitrógeno. Se añaden 2,26 g (15 mmoles) de terc-butildimetilclorosilano (C1TBDMS). La mezcla se agita bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 4 horas 30 min. Se vierten 100 ml de agua destilada y 100 ml de acetato de etilo en el medio de reacción y la mezcla se agita. Las fases se separan y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3x70 ml). La solución orgánica reunida se lava con 100 ml de agua destilada, se seca sobre MgSO₄ anhidro y se evapora. El residuo se purifica en cromatografía de gel de sílice (eluyente: acetato de etilo/éter de petróleo, 1/5, v/v) para dar 3,67 g del producto de reacción en forma de cristales blancos.

15 Se mezclan 3,66 g de este producto obtenido con 40 ml de metanol, 10 mg de cerio(III) cloruro hidratado (CeCl₃·7 H₂O) en un matraz de 250 ml provisto de una agitación magnética. Se forma una suspensión. Se añade 0,40 g (10,6 mmoles) de borohidruro de sodio (NaBH₄, 98%) en 3 veces durante 5 min. Se mantiene la agitación a temperatura durante 10 min. El medio de reacción se evapora a 30°C con la ayuda de un evaporador rotativo bajo presión reducida. El residuo se mezcla con 50 ml de acetato de etilo y 50 ml de agua destilada. Las fases se decantan y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (2x50 ml). La solución orgánica reunida se seca sobre MgSO₄ anhidro y se evapora para dar el producto bruto que se purifica después en cromatografía de gel de sílice (eluyente: acetato de etilo/éter de petróleo, 1/4, v/v). Se forman 3,5 g (rendimiento = 86,5%) del producto (VIII β) en forma de cristales blancos.

25 ¹HRMN (CDCl₃): δ 5,29(1H, H₄), 4,18 (1H, H₃), 3,56(1H, t, H₁₇), de 2,40 a 0,80 (m), 1,08(3H, s, H₁₉), 0,89(9H, s, t-Bu), 0,74(3H, s, H₁₈), 0,02(6H, s, Me₂Si). ¹³CRMN(CDCl₃): δ 147,8, 123,5, 81,8, 68,0, 54,8, 50,5, 43,3, 37,2, 37,1, 36,1, 35,5, 32,8, 32,2, 31,0, 29,6, 25,9, 23,6, 20,8, 19,1, 18,9, 11,4, -4,3, -4,6.

5.2 Preparación de 3 α -Hidroxi -17 β -O-(t-butildimetilsilil)-4-androsteno (IX α)

30 En un matraz de 500 ml, se introducen 4,46 g (11,0 mmoles) del producto (VIII β) preparado, 50 ml de benceno anhidro, 5,78 g (22,0 mmoles) de trifenilfosfina y 2,69 g (22,0 mmoles) de ácido benzoico bajo nitrógeno. Se disuelven 3,84 g (22,0 mmoles) de azodicarboxilato de dietilo (DEAD) en 10 ml de benceno anhidro y la solución obtenida se añade gota a gota en el matraz bajo la protección de nitrógeno durante 10 min. El medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Se vierten 50 ml de solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 1,0 M) en el medio y las fases se separan. La fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3x30 ml) y la solución orgánica reunida se lava con 50 ml de solución de NaHCO₃ (1,0 M), después con 50 ml de agua destilada, se seca sobre MgSO₄ anhidro y se evapora. El residuo se recoge en 150 ml de etanol y se añaden 30 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH, 1,0 N). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 noche y a 70°C durante 3 horas. No hay más producto de partida sobre la CCM (eluyente: acetato de etilo /éter de petróleo, 1/9, v/v). El medio de reacción se evapora hasta 50 ml con un evaporador rotativo. Se introducen 50 ml de agua destilada y 100 ml de acetato de etilo. Las fases se separan después de la agitación. La fase acuosa se extrae con acetato de etilo (2x70 ml). La solución orgánica obtenida se lava con agua destilada (70 ml), se seca sobre MgSO₄ anhidro y se evapora bajo presión reducida para dar el producto bruto. La purificación se efectúa con la ayuda de una columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente: acetato de etilo /éter de petróleo, 1/7, v/v). Se obtienen 2,19 g (rendimiento = 47,1 %) del producto (IX α).

50 ¹HRMN (CDCl₃): δ 5,45(1H, H₄), 4,07(1H, H₃), 3,52(1H, t, H₁₇), de 2,40 a 0,80 (m), 0,97(3H, s, H₁₉), 0,86(9H, s, t-Bu), 0,71(3H, s, H₁₈), 0,00(6H, s, Me₂Si). ¹³CRMN(CDCl₃): δ 150,2, 120,8, 81,7, 64,2, 54,3, 50,4, 43,3, 37,6, 37,1, 35,9, 32,4(2C), 31,7, 30,9, 27,9, 25,9, 23,6, 21,2, 18,2, 18,1, 11,4, -4,3, -4,7.

5.3 Preparación del derivado de testosterona de fórmula (Ia α)

55 En un matraz de tres bocas de 250 ml provisto de una agitación magnética, Se disuelven 3,95 g (9,8 mmoles) del producto (IX α) en 65 ml de diclorometano anhidro bajo nitrógeno. Se añaden 100 mg de acetato de Rodio(II) dimérico. La solución se enfría hasta 0°C. Una solución de 4,0 g (35 mmoles) de diazoacetato de etilo en 25 ml del diclorometano anhidro se prepara y se añade gota a gota en el matraz de tres bocas bajo nitrógeno durante 1 hora. Se deja volver el medio de reacción hasta temperatura ambiente y se mantiene la agitación durante 4 horas. Se añaden 100 ml de agua destilada y las fases se separan. La fase acuosa se extrae con éter etílico (3x100 ml). La

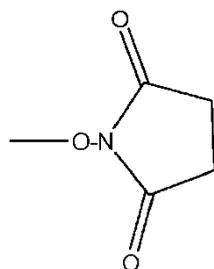
solución orgánica reunida se seca sobre MgSO_4 anhidro y se evapora. El residuo obtenido se purifica con una columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente: acetato de etilo/éter de petróleo, 1/6, v/v) para dar 3,2 g de producto que se utiliza directamente a continuación para la síntesis.

- 5 Se disuelven 3,0 g del producto así obtenido en 20 ml de tetrahidrofurano (THF) anhidro y la solución se enfría hasta 0°C . Se añaden 15 ml de solución de tetra-n-butilamonio fluoruro (Bn_4NF , 1,0 M en THF) bajo nitrógeno. Se deja volver el medio de reacción hasta temperatura ambiente y se mantiene la agitación durante 22 horas. La mezcla de reacción se evapora con la ayuda de un evaporador rotativo. Se mezclan 100 ml de agua destilada y 100 ml de éter etílico con el residuo. Las fases se decantan y la fase se extrae con éter etílico (3x50 ml). La solución orgánica se
 10 seca sobre MgSO_4 anhidro y se evapora. Una purificación cromatográfica del residuo formado sobre gel de sílice (eluyente: acetato de etilo/éter de petróleo, 1/1, v/v) da 1,0 g de producto (aceite transparente) que se disuelve después en 30 ml de etanol. Se introducen 6,0 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH , 1,0 N) en la solución a temperatura ambiente y la mezcla se agita durante 30 min. La CCM (eluyente: cloroformo/acetona/ácido acético, 70/25/2, v/v/v) se utiliza para controlar la evaluación de la saponificación. El medio de reacción se neutraliza con ácido clorhídrico (HCl , 1,0 N) a pH 6 y se evapora in seco a temperatura ambiente bajo presión reducida. El
 15 producto bruto así formado se purifica sobre una columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente: cloroformo/metanol, 4/1, v/v). Se obtienen 950 mg del producto (Ia α).

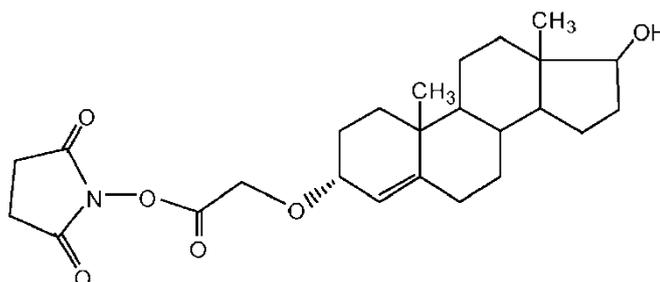
20 $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3): δ 5,44(1H, H_4), 4,11(2H, s), 3,84 (1H, H_3), 3,63(1H, t, H_{17}), de 2,40 a 0,80 (m), 1,01(3H, s, H_{19}), 0,78(3H, s, H_{18}). $^{13}\text{CRMN}$ (CD_3OD): δ 175,8, 152,2, 119,2, 82,4, 73,5, 66,7, 55,3, 52,0, 44,0, 38,7, 37,9, 37,2, 33,6, 33,4, 33,1, 30,5, 25,0, 24,2, 22,2, 18,7, 11,6. IR (cm^{-1}): 3375, 2925, 2869, 2846, 1725, 1589, 1434, 1213, 1105, 1072. MS (LC-MS): 347,2 (M-H).

25 Ejemplo 6: Preparación de un derivado de testosterona de la invención de fórmula (Ia)

- 30 17β -hidroxi-3 α -carboximetoxi-androst-4-eno N-hidroxisuccinimida éster o compuesto de fórmula (Ia) en la que n=1 y Y=



30



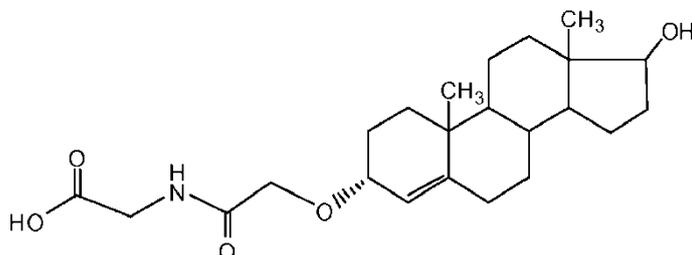
Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 5, después se prosigue de la siguiente manera.

- 35 Se introducen 100 mg (0,29 mmoles) del producto (Ia α) sintetizado en el ejemplo 5, 34,1 mg (0,29 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (HOSu) y 18 ml de tetrahidrofurano (THF) anhidro en un matraz de 50 ml provisto de una agitación magnética. Se obtiene una suspensión. Se añaden 59,8 mg (0,29 mmoles) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). El medio se agita a temperatura ambiente durante 1 noche. La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se
 40 evapora a 25°C . Se introducen 5 ml de dimetoximetano anhidro y la mezcla se filtra. El filtrado se evapora a 25°C con la ayuda de un evaporador rotativo. El residuo se seca con bomba al vacío, se lava con 5 ml de hexano anhidro y se seca bajo presión reducida. Se obtienen 86 mg (66,5%, pureza: 90% en HPLC) del derivado de testosterona (Ia).

45 $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3): δ 5,50(1H, H_4), 4,44(2H, s), 3,85 (1H, H_3), 3,61(1H, t, H_{17}), 2,84(4H, s), de 2,40 a 0,80 (m), 0,97(3H, s, H_{19}), 0,74(3H, s, H_{18}). $^{13}\text{CRMN}$ (CDCl_3): δ 169,0, 166,7, 152,2, 117,2, 81,9, 73,3, 63,6, 53,9, 50,6, 43,0, 37,7, 36,6, 35,8, 32,4, 32,2, 31,9, 30,4, 25,6, 24,2, 23,4, 21,1, 18,1, 11,1. IR (cm^{-1}): 3517, 3324, 2917, 2848, 1780, 1729, 1703, 1427, 1379, 1204, 1066. MS (LC-MS): 447,2 (M+H) $^+$.

Ejemplo 7: Preparación de un derivado de testosterona de fórmula (Ib α)

Compuesto de fórmula (I α) en la que n=1 y Y=-NH-CH₂-COOH

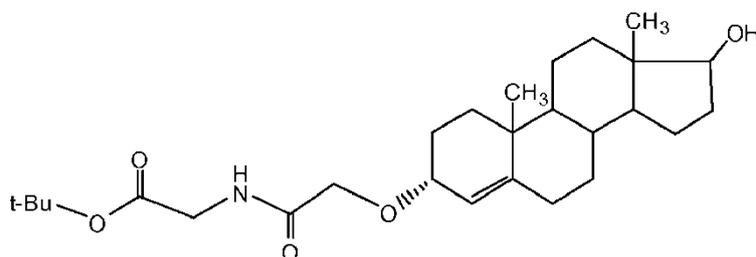


5

Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 5, después se prosigue de la siguiente manera.

7.1 Preparación del compuesto (VI α) en el que m=n=1

10



Se mezclan 380 mg (1,09 mmoles) del producto (I α), 125,5 mg (1,09 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (HOSu) y 30 ml de tetrahidrofurano (THF) anhidro en un matraz de 100 ml bajo la protección de nitrógeno. Se introducen 225 mg (1,09 mmoles) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). El medio se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La CCM (eluyente: cloroformo/metanol, 5/1, v/v) se utiliza para controlar la reacción. Se filtra la mezcla que contiene el producto (VI α , n=1).

15

Se introducen rápidamente 6 ml de la solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 1,0 M) y 142 mg (1,09 mmoles) de glicina terc-butiléster en el filtrado. La mezcla se agita a 25°C durante 30 min. después se concentra hasta 10 ml bajo presión reducida. Se añaden 50 ml de agua destilada y 50 ml de acetato de etilo. Las fases se decantan y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo (3x50 ml). La solución orgánica reunida se seca sobre MgSO₄ y se evapora. El producto bruto se purifica después sobre una columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente: acetato de etilo al 100%) para dar 440 mg del producto (VI α , m=n=1).

20

25

¹HRMN (CDCl₃): δ 7,12(1H, NH), 5,48(1H, H₄), 4,01(2H, m), 3,80(1H, H₃), 3,66(1H, t, H₁₇), de 2,40 a 0,70 (m), 1,48(s, t-Bu), 0,99(3H, s, H₁₉), 0,76(3H, s, H₁₈). ¹³CRMN(CDCl₃): δ 170,8, 168,6, 151,6, 117,5, 82,2, 81,6, 72,8, 67,6, 53,8, 50,5, 42,9, 41,3, 37,6, 36,6, 35,8, 32,3, 32,2, 32,0, 30,3, 28,0, 24,3, 23,3, 21,0, 18,1, 11,1.

30 7.2 Preparación del derivado de testosterona de fórmula (Ib α)

Se disuelven 440 mg (0,95 mmoles) del producto (VI α , m=n=1) sintetizado en 30 ml de metanol y se forma una solución transparente. Se añaden 3 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH, 1,0 N) a temperatura ambiente. Se mantiene la agitación durante 4 horas. No hay más presencia del producto de partida (VI α) sobre la CCM (eluyente: cloroformo/metanol, 4/1, v/v). El medio de reacción se neutraliza con ácido clorhídrico (HCl, 1,0 N) a pH = 6 y se evapora a 25°C bajo presión reducida. El residuo se purifica con una columna de cromatografía de gel de sílice (eluyente: cloroformo/metanol, 2,5/1, v/v). Se obtienen 380 mg (rendimiento = 98,6%) del producto (I α).

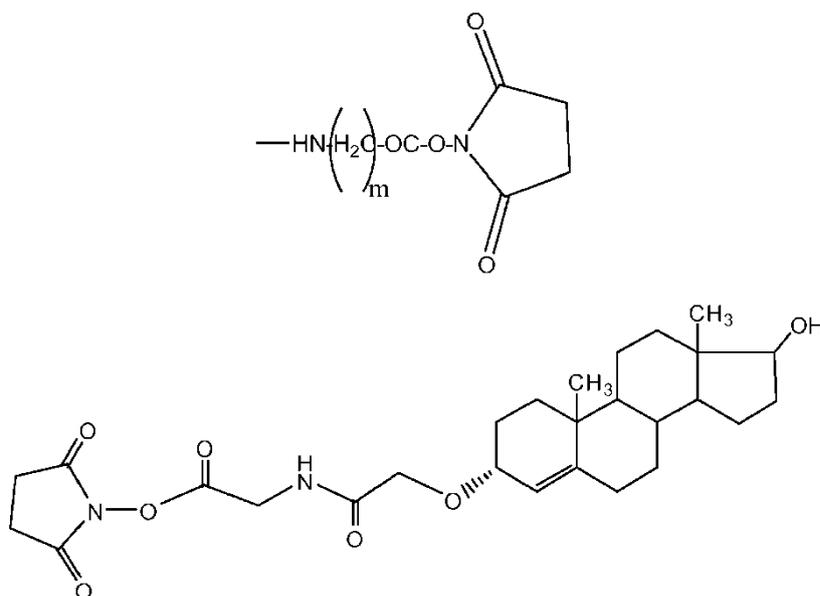
35

¹HRMN (CD₃OD): δ 7,88(1H, t, ²J = 3,13Hz, NH), 5,50(1H, d, ²J = 4,06Hz, H₄), 4,00(2H, d, ²J = 3,13Hz), 3,90(2H, s), 3,80(1H, t, H₃), 3,56(1H, t, H₁₇), de 2,40 a 0,70 (m), 1,02(3H, s, H₁₉), 0,76(3H, s, H₁₈). ¹³CRMN(CD₃OD): δ 174,2, 173,5, 152,5, 119,0, 82,4, 74,0, 68,3, 55,4, 52,0, 44,0, 42,5, 38,7, 37,9, 37,2, 33,7, 33,4, 33,2, 30,6, 25,3, 24,3, 22,2, 18,6, 11,6. IR (cm⁻¹): 3369, 2921, 2847, 1715, 1624, 1538, 1436, 1422, 1233, 1078. MS (LC-MS): 404,4 (M-H), 809,9 (2M-H).

40

45 Ejemplo 8: Preparación de un derivado de testosterona de la invención de fórmula (I α)

Compuesto de fórmula (I α) en la que m=n=1 y Y=



5 Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 7, después se prosigue de la siguiente manera.

El producto de fórmula (Ib α) preparado en el ejemplo 7 (120 mg, 0,295 mmoles) se disuelve en 10 ml de 1,2-dimetoxietano (DME) anhidro en un matraz provisto de una agitación magnética. Se introducen 35,1 mg (0,295 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (HOSu) y se forma una solución transparente. Se añaden 61,7 mg (0,295 mmoles) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). El medio se agita a temperatura ambiente durante 4 horas 30 min. La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se evapora sin calentar con la ayuda de un evaporador rotativo. El residuo obtenido se lava con 6,0 ml de diclorometano anhidro, después se seca al vacío. Se obtienen 90,4 mg (rendimiento = 61,0 %, pureza 85% en HPLC) del producto (I α). El producto se conserva a -20°C bajo nitrógeno.

15 $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3): δ 7,17(1H, NH), 5,42(1H, H $_4$), 4,45(2H, d), 4,03(2H, s), 3,76(1H, H $_3$), 3,62(1H, t, H $_{17}$), 2,84(4H, s), de 2,30 a 0,80 (m), 1,05(3H, s, H $_{19}$), 0,75(3H, s, H $_{18}$). $^{13}\text{CRMN}$ (CDCl_3): δ 171,2, 168,7, 165,7, 152,0, 117,4, 81,9, 73,1, 67,5, 53,9, 50,6, 43,0, 38,3, 37,7, 36,6, 35,8, 32,4, 32,3, 32,1, 30,5, 25,6, 24,3, 23,4, 21,1, 18,2, 11,1.

20 Ejemplo 9: Preparación de un conjugado 1 de la invención 17 β -hidroxi-3 β -carboximetoxiandroster-4-eno/fosfatasa alcalina

Se dializa 0,3 ml de una solución de fosfatasa alcalina (PAL) recombinante a 20 mg/ml (Roche, Ref. 03-535-452), en un tubo Spectra/Por® (límite de corte 6000-8000 Da, Spectrum Laboratories, USA) frente a 300 ml de tampón borato 50 mM pH 7,6, bajo agitación magnética, durante una noche, a 2-8°C. En la salida de la diálisis, la concentración de la proteína se determina por lectura de la densidad óptica a 280 nm y esta concentración se ajusta a 8 mg/ml.

El éster 17- β -hidroxi-3- β -carboximetoxiandroster-4-eno-N-hidroxisuccinimida (o NHS) obtenido en el ejemplo 2 se recoge en dimetilformamida (DMF) a una concentración de 1 mg/ml.

30 Para un acoplamiento de tipo (1-3) (1 mole de fosfatasa alcalina-3 moles de derivado de testosterona), se mezclan 312,5 μl de la solución de PAL con 30 μl de la solución de éster 17- β -hidroxi-3- β -carboximetoxiandroster-4-eno-NHS. Para un acoplamiento de tipo (1-5), se mezclan 312,5 μl de la solución de PAL con 50 μl de la solución de éster. Las mezclas son incubadas durante 1h al baño maría a 30°C, bajo agitación magnética suave.

35 Después, la reacción se bloquea por adición de lisina 1 mM diluida en agua. La cantidad de lisina añadida es equimolar a la cantidad de éster utilizada para el acoplamiento. Se añaden entonces 68 μl de la solución de lisina para el acoplamiento de tipo (1-3) y 112 μl para el acoplamiento de tipo (1-5). Las mezclas con incubadas durante 20 min sobre una rueda, a 18/25°C.

40 Después de detener la reacción, los conjugados se dializan en un tubo Spectra/Por® (límite de corte de aproximadamente 7000 Da) durante 1h a 18/25°C frente a 250 ml de tampón Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 9 g/l, MgCl $_2$ 5 mM, ZnCl $_2$ 0,1 mM, azida 0,9 g/l, bajo agitación magnética. Al final de 1h, los tubos se transfieren en nuevos baños que contienen todavía 250 ml del mismo tampón. Se prosigue la diálisis durante la noche a 2/8°C, bajo agitación magnética.

45 En la salida de la diálisis, el volumen de los conjugados se complementa con 1 ml con un tampón de diálisis. Los conjugados se purifican después por cromatografía de interacciones hidrófobas utilizando una columna RESOURCE

Phenyl (Cat No. 17-1186-01, GE Healthcare Lifesciences) montada sobre una cadena de cromatografía ÄKTA. El caudal de la bomba se ajusta a 0,5 ml/min. El tampón TA es un Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 9 g/l, MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, azida 0,9 g/l, (NH₄)₂SO₄ 0,8M. El tampón TB es un Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 9 g/l, MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, azida 0,9 g/l, es el tampón de diálisis.

5 La columna RESOURCE Phenyl se equilibra en tampón TA. El conjugado a purificar se mezcla volumen por volumen (475 µl conjugado y 475 µl tampón) con el tampón Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 9 g/l, MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, azida 0,9 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1,6 M. Esta etapa permite obtener el conjugado en el tampón TA. La inyección del
10 conjugado se sigue de un lavado de 30 ml en tampón TA. Después un gradiente del 0 al 100% de TB se aplica durante 30 ml, después un lavado en tampón TB durante 10 ml y un lavado en agua durante 10 ml. El desarrollo de la cromatografía se sigue por medición de la densidad óptica a 280 nm. Las fracciones a partir de 42 ml de elución hasta 51 ml (es decir en total 10 ml) se recuperan, se reúnen y después se concentran por diafiltración utilizando una célula Amicon (Amicon stirred cells, Millipore), una membrana Amicon PM con un límite de corte de 10 000 Da y el
15 tampón TB. Durante esta etapa, el volumen de la solución de conjugado está reducida a aproximadamente 1 ml. Los conjugados son conservados a 2/8°C hasta su utilización en un inmunoensayo.

Ejemplo 10: Determinación de la testosterona utilizando el conjugado 1 de la invención 17-β-hidroxi-3-β-carboximetoxiandrost-4-eno/fosfatasa alcalina y comparación con unas determinaciones que utilizan un conjugado de la técnica anterior

20 Se ha utilizado el kit VIDAS[®] (bioMérieux) de determinación de la testosterona (Cat. No 30418) como inmunoensayo de referencia, se trata de un kit comercial con un marcado CE. Esta determinación se describe en la noticia del kit ref. 09345 F-fr-2010/08 y se realiza utilizando el dispositivo de inmunoanálisis VIDAS[®].

25 El cono de uso único sirve al mismo tiempo de fase sólida para la reacción y de sistema de pipeteado. El cartucho está compuesto de 10 pocillos recubiertos de una hoja de aluminio sellada y etiquetada. El primer pocillo comprende una parte prerecordada para facilitar la introducción de la muestra. El último pocillo es una cubeta óptica en la que la fluorescencia del sustrato se mide. Los diferentes reactivos necesarios para el análisis son contenidos en los pocillos intermedios.

30 El cono contenido en el kit VIDAS[®] de determinación de la testosterona (bioMérieux Cat. No 30418) se ha sensibilizado por un anticuerpo policlonal de oveja anti-IgG de conejo, después por un anticuerpo policlonal de conejo anti-testosterona. La superficie se pasiva y está lista para el uso.

35 La muestra a ensayar se introduce en el primer pocillo del cartucho. Después, todas las etapas de la reacción de análisis se realizan automáticamente por el aparato de análisis VIDAS[®]. La muestra a ensayar se mezcla con el conjugado que es un derivado de testosterona marcado con fosfatasa alcalina, pero cuya posición 3 no se modifica como en la presente invención. Se denominará este conjugado "Conjugado VIDAS[®]" o conjugado de la técnica anterior.

40 Se efectúa entonces una competición entre la testosterona presente en la muestra y el derivado testosterona del conjugado frente a sitios del anticuerpo anti-testosterona fijado sobre el cono. Las etapas de lavado se efectúan con el tampón Tris-NaCl (0,05 mol/l) pH 7,4 o de la dietanolamina (1,1 mol/l) pH 9,8 y permiten eliminar los compuestos no fijados. Durante la etapa final de revelación, el sustrato 4-metilombeliferil fosfato se aspira y después se empuja
45 en el cono; la enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este sustrato en 4-Metilombeliferona cuya fluorescencia emitida se mide a 450 nm. El valor de la señal de fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración de testosterona presente en la muestra. Esta concentración se calcula con respecto a una curva de calibración.

50 Para las otras determinaciones, se han utilizado los reactivos del kit VIDAS[®] testosterona (Cat. No 30418) y el protocolo de determinación indicado en la noticia del kit, con las modificaciones siguientes:

* unos conos se sensibilizaron con otros anticuerpos anti-testosterona: 2 inmunoglobulinas G (IgG) monoclonales de ratones, los clones 19E10H6 y 15H9H10 (bioMérieux), que se denominarán respectivamente Ab1 y Ab2 , y 1 IgG monoclonal de oveja, el clon testo3.6A3 (Bioventix), que se denominará Ab3. Como en el cono del formato de ensayo de referencia, los anticuerpos anti-testosterona se han capturado por unos anticuerpos policlonales anti-especies adsorbidos sobre el cono previamente. Se trata de un anticuerpo policlonal de oveja anti-IgG de ratón para Ab1 y Ab2, y de un anticuerpo policlonal de asno anti-IgG de oveja para Ab3. Los anticuerpos anti-especies se diluyen a una concentración de entre 1 y 12 µg/ml en la solución de sensibilización. Después de 6 h de incubación a +18/25°C, se efectúa un lavado con una solución salina. Después, la solución de anticuerpos anti-testosterona que contiene un agente de saturación de tipo proteico o peptídico se añade (concentración del anticuerpo: 0,01-0,2 µg/ml). La sensibilización / pasivación se prosigue a +18/25°C durante la noche. Después, los conos se vacían y se secan.

65 * los conos sensibilizados con el anticuerpo Ab1 se ensayan con el conjugado VIDAS[®], diluido al 1/2,5 para los ensayos con el anticuerpo monoclonal. Los conos sensibilizados con los anticuerpos Ab2 y Ab3 son ensayados con

el conjugado 1 de la invención preparado en el ejemplo 9. Este último conjugado se utiliza a una concentración de 3 ng/ml para los ensayos con los conos sensibilizados al anticuerpo Ab2 y 2,5 ng/ml para los conos sensibilizados al anticuerpo Ab3.

5 * la conversión de la dosis se realiza gracias a una gama estándar de 10 puntos fabricada suplementando suero de mujer con testosterona en solución etanólica. Las concentraciones nominales de cada uno de los puntos son: 0,001 ng/ml - 0,03 ng/ml - 0,18 ng/ml - 0,41 ng/ml - 0,76 ng/ml - 1,29 ng/ml - 1,91 ng/ml - 3,82 ng/ml - 7,48 ng/ml - 11,55 ng/ml.

10 * el volumen de toma de muestra para cada análisis es de 200 µl.

La gama estándar se midió con cada formato de análisis. La tabla 1 siguiente resume los resultados obtenidos en señal RFV (= relative fluorescence value) y relación B/B0%, para las diluciones de la gama patrón. La relación B/B0 es la señal obtenida para el punto de gama ensayo dividido por la señal obtenida para el punto de gama 0,001 ng/ml de testosterona, multiplicado por 100.

Tabla 1

[c] Testosterona (ng/ml)	REF = Kit VIDAS®		Ab1 + conjugado VIDAS®		Ab2 + conjugado 1 de la invención		Ab3 + conjugado 1 de la invención	
	Señal (RFV)	B/B0%	Señal (RFV)	B/B0%	Señal (RFV)	B/B0%	Señal (RFV)	B/B0%
0,001	4202	100	4799	100	4077	100	3209	100
0,03	3630	86	4412	92	3490	86	2492	78
0,18	3056	73	3537	74	2935	72	1700	53
0,41	2645	63	3093	64	2527	62	1403	44
0,76	2440	58	3320	69	2238	55	1286	40
1,29	2057	49	2940	61	1880	46	960	30
1,91	1939	46	2836	59	1729	42	990	31
3,82	1493	36	2391	50	1264	31	644	20
7,48	1183	28	2163	45	905	22	380	12
11,55	880	21	1849	39	632	16	205	6

20 Los valores de relación B/B0% se representan en la figura 1 mediante un gráfico que da estos valores en función del logaritmo de la concentración de los puntos de la gama patrón para cada formato, a saber dos formatos que utilizan un conjugado de la técnica anterior ((i) REF que es el análisis de referencia de la técnica anterior que corresponde al kit comercial VIDAS® de determinación de la testosterona (bioMérieux, Cat. No 30418), y (ii) Ab1 + conjugado VIDAS®), y dos formatos que utilizan un conjugado 1 de la invención (Ab2 + conjugado 1 de la invención, y Ab3 + conjugado 1 de la invención).

25 El gráfico en la figura 1 muestra que los dos formatos de análisis más sensibles son los que utilizan el conjugado de la invención. En efecto, el formato de ensayo más sensible es el formato que asocia el anticuerpo Ab3 y el conjugado 1 de la invención. Una disminución de la señal del 50% se observa a partir de 0,2 ng/ml de testosterona aproximadamente. Para el formato que asocia el anticuerpo Ab2 y el conjugado 1 de la invención, así como el análisis de referencia sobre VIDAS®, se necesita aproximadamente 1 ng/ml de testosterona para alcanzar una relación B/B0 del 50%. El formato Ab2 + Conjugado 1 de la invención es ligeramente más sensible que el formato de referencia. Finalmente, con el formato Ab1 + Conjugado VIDAS®, se necesitan 3,82 ng/ml de testosterona para alcanzar los 50%. Es el formato menos sensible.

35 En un segundo tiempo, para confirmar que el formato Ab2 + Conjugado 1 de la invención es mucho más sensible que el formato de referencia REF, kit VIDAS® Testosterona, cuyo campo de medición preconizado en la noticia se extiende de 0,1 a 13 ng/ml, estos dos formatos se han comparado sobre unas muestras de suero obtenidas de "Etablissements Français du Sang". Se trata de 4 muestras recogidas en mujeres (códigos en F) en las que la dosis de testosterona sérica es inferior a 1 ng/ml y de 2 muestras recogidas en hombres (códigos en H). Los resultados se presentan en la tabla 2. La concentración teórica se ha determinado por un laboratorio tercero, con una técnica que permite medir de manera justa las concentraciones inferiores a 1 ng/ml como la espectrometría de masa ID/GC-MS. La relación [c] medida / [c] teórica X 100 presentada en la tabla 2 para cada análisis permite estimar la precisión de cada ensayo, significando [c] concentración. Cuanto más cerca del 100% esté esta relación, más exacto será el ensayo.

Tabla 2

Código muestra	REF = Kit VIDAS®			Ab2 + Conjugado 1 de la invención	
	[c] teórica	[c] medida	[c] me / [c] te x 100	[c] medida	[c] me / [c] te x100
F37	0,11	0,25	223	0,13	118
F38	<0,025	0,09	340	0,03	100
F45	0,07	0,20	279	0,07	100

F46	0,21	0,41	193	0,30	140
H29	2,38	3,20	134	2,97	125
H34	3,94	3,35	85	4,05	103

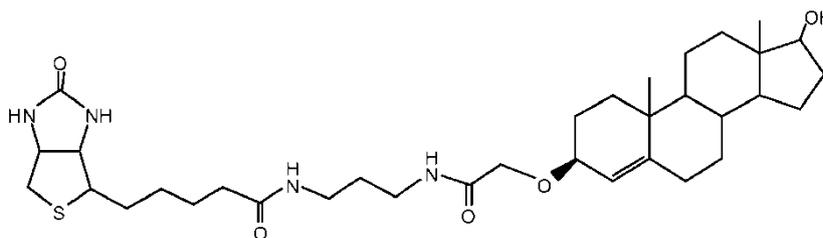
Los resultados en la tabla 2 muestran que el formato que utiliza un conjugado de la invención es más justo que el análisis de referencia sobre VIDAS[®], sobre todo para la determinación de los bajos porcentajes de testosterona sérica encontrados en las mujeres.

5

Ejemplo 11: Preparación du Conjugado 2 de la invención 17-β-hidroxi-3-β-carboximetoxiandro-4-emo/biotina

La molécula se denominará aquí de manera abreviada testosterona-3β-EMC-DAP-biotina, siendo DAP el diaminopropilo y presenta la fórmula siguiente.

10



En un matraz de 50 ml provisto de una agitación magnética, se disuelven 100 mg (0,287 mmoles) de ácido 17-β-hidroxi-3-β-carboximetoxiandro-4-eno obtenidos del ejemplo 1 en 7 ml de dimetoxietano (DME) anhídrido. Se añaden 50 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) y se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 3 min. Se introducen 69 mg (0,334 mmoles) de N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC) y se obtiene una solución transparente. El medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 noche.

15

La mezcla de reacción se filtra y el filtrado así obtenido se utiliza directamente. Se mezclan 100 mg (0,241 mmoles) de N-(+)-Biotinil-3-aminopropilamonio trifluoroacetato (biotina-NH-DAP, sal de TFA, Sigma-Aldrich Cat. N° 71776) con 1,5 ml de solución de NaHCO₃ a 1N y después se añaden en el filtrado. Se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 14 h.

20

El medio de reacción se seca a temperatura ambiente bajo presión reducida. El residuo obtenido se purifica en cromatografía sobre gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm, Merck Cat. N° 109385) con el eluyente: diclorometano/metanol, 8/1, v/v para empezar y diclorometano metanol, 5/1, v/v para terminar la purificación. Se obtienen 125 mg de producto, lo que corresponde a un rendimiento del 82%. La testosterona-3β-EMC-DAP-biotina es un polvo blanco.

25

El producto se analiza en cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La columna utilizada es una Thermokromasil C18, 150x4,6mm y el eluyente es una mezcla de acetonitrilo, agua (0,1% de ácido trifluoroacético) en gradiente. La cromatografía se sigue mediante la medición de la absorbancia a 214 nm. La pureza del producto así estimada es del 90,1%.

30

Ejemplo 12: Determinación de la testosterona utilizando el Conjugado 2 de la invención testosterona-3β-EMC-DAP/biotina

35

En una microplaca de 96 pocillos (Nunc Maxisorp F96) se distribuyen 100 μl/pocillos del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc IgG de cabra (clon 9A4A5, bioMérieux) diluido a 10 μg/ml en tampón PBS 1x. La microplaca se incuba durante la noche a temperatura ambiente a fin de obtener la adsorción del anticuerpo. La microplaca se vacía, después se añaden 300 μl/pocillo de tampón de pasivación (tampón Tris 0,2 M pH 6,2) que contiene un agente de saturación de tipo proteico o peptídico, y el anticuerpo anti-testosterona monoclonal de oveja clon 3.6A3 (Ab3 - bioVentix) diluido a 0,2 μg/ml. La microplaca se incuba durante 1 h a 37°C. Se efectúan tres lavados TBS (Tris buffered saline)-Tween[®]-20 0,05%. Los puntos de gama utilizados en el ejemplo 10 se diluyen al ½ en un tampón Tris; 100 μl de estas diluciones son distribuidos en los pocillos de la placa. Después de 1 h de incubación a 37°C, los pocillos se vacían y se añade 0,2 ng/pocillo del conjugado 2 de la invención testosterona-3β-EMC-DAP-biotina en tampón Tris. La reacción con el conjugado se efectúa durante 15 minutos a 37°C, y se sigue de 3 lavados. Se añaden 100 μl/pocillo de una solución de estreptavidina-peroxidasa (Jackson Immunoresearch Cat. N° 016-30-084) diluida al 1/20,000 en TBS-Tween[®]-20 0,05%, BSA 2% y la microplaca se incuba durante 30 min a 37°C. Después de 3 lavados, se añaden 100 μl/pocillo del sustrato 1-step Ultra TMB (Thermo Scientific, Cat. N° 34028) y la microplaca se incuba durante 5 min. a temperatura ambiente, protegida de la luz. La reacción se detiene después mediante adición de 100 μl de ácido sulfúrico 2M. La densidad óptica (DO) a 450 nm y a 630 nm se mide en un lector de microplaca. Para cada pocillo, se sustrae la densidad óptica a 630 nm de la densidad óptica a 450 nm. Los resultados obtenidos aplicando este protocolo son presentados en la tabla 3.

45

50

55

Tabla 3

[c] Testosterona (ng/ml)	DO ₄₅₀ -DO ₆₃₀	B/B0%
0,001	2,52	100
0,03	2,10	83
0,18	1,88	74
0,41	1,61	64
0,76	1,36	54
1,29	1,00	40
3,82	0,42	17
11,55	0,17	7

5 Los valores de relación B/B0% de la tabla 3 se representan en la figura 2, mediante un gráfico que da estos valores en función del logaritmo de la concentración de los puntos de la gama patrón. La figura 2 recoge los valores obtenidos en el ejemplo 10 para el formato que utiliza Ab2 + conjugado 1 de la invención.

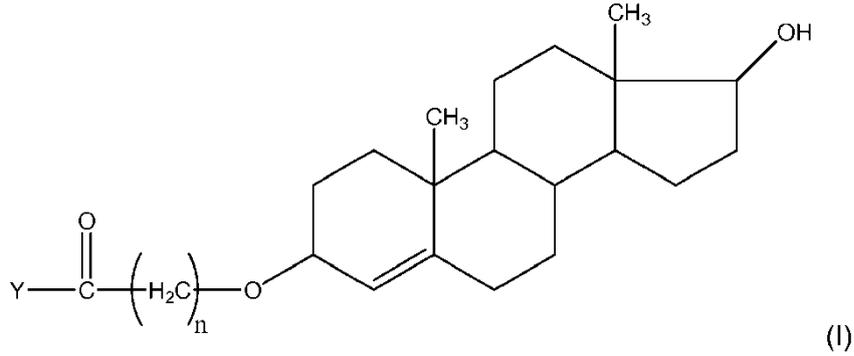
10 Este gráfico muestra que la apariencia de la gama de determinación de la testosterona obtenida con el anticuerpo Ab3 + el conjugado 2 de la invención testosterona-3 β -EMC-DAP-biotina sobre microplaca es comparable a la obtenida por el formato Ab2 + conjugado 1 de la invención sobre VIDAS[®] en el ejemplo 10. Esta determinación en microplaca con un conjugado de la invención es por lo tanto más sensible que las determinaciones VIDAS[®] que utilizan el conjugado VIDAS[®].

15 Referencias bibliográficas

- Cekan, S. Z., 1979, J. Steroid Biochem., II: 1629.
- Cook B y Bestall G.H., 1987, Steroid hormones a practical approach, Ed Green B. and Leake R.E., Chapter 1.
- 20 Demers L.M., 2010, Maturitas, 67: 39-45.
- Fiet J *et al.*, 2004, Steroids, 69(7): 461-471.
- Litwack G., 1992, Biochemistry of Hormones II: Steroid hormones. In DEVLIN T. M., Textbook of Chemistry with clinical correlations, 3,d Edition, Wiley J. and Sons, 901-925.
- 25 Moneti G; *et al.*, 1987, J. Steroid Biochem., 27(1-3): 53.
- Rassasie, M.J., *et al.*, 1992, Steroids, 57: 112.
- 30 Rosner W. *et al.*, 2007, JCEM, 92(2): 405-413.
- Owen, W.E., *et al.*, 2010, Clinica Chimica Acta, 411: 1073.
- 35 Stabler T.V., *et al.*, 1991, Clin. Chem., 37(11): 1987.
- Thienpont, L.M., *et al.*, 2008, Clin. Chem., 54(8):1290.
- Ueschiba, H. *et al.*, 1991, Clin. Chem., 37(8): 1329.
- 40 Vingler P., *et al.*, 1991, J. of Chromatography, 571: 73.
- Wong, S.S., 1991, Reactive groups of proteins and their modifying agents. In Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press Inc, p33-39.
- 45 Wudy, S.A., *et al.*, 1992, Steroids, 57: 319.

REIVINDICACIONES

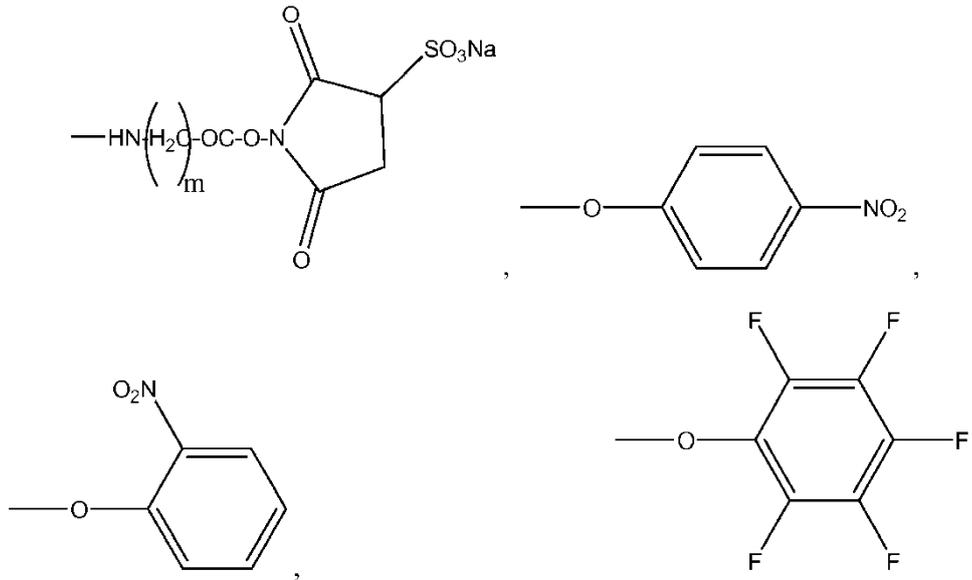
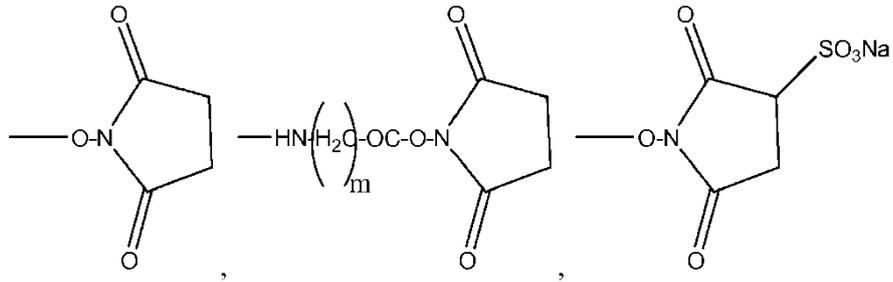
1. Derivado de testosterona de fórmula general (I) siguiente:

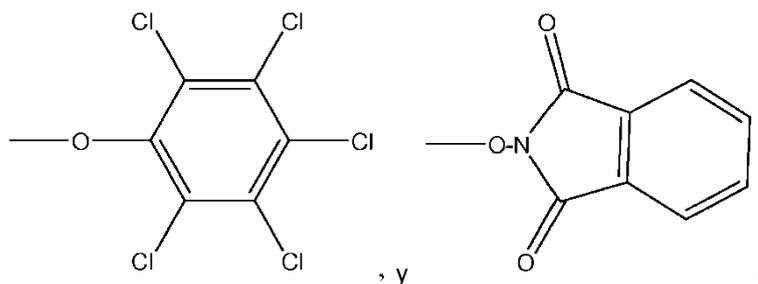


en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa un grupo activado o listo para activarse que permite la formación de un enlace de amida con una amina primaria de una molécula.

10 2. Derivado de testosterona según la reivindicación 1, caracterizado por que n está comprendido entre 1 y 5

3. Derivado de testosterona según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que Y se selecciona entre -OH, -NH-(CH₂)_m-COOH, -N₃,

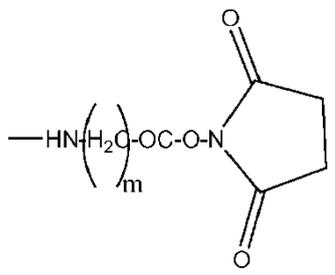




siendo m un número entero comprendido entre 1 y 10.

5 4. Derivado de testosterona según la reivindicación 3, caracterizado por que m está comprendido entre 1 y 5.

5. Derivado de testosterona según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que Y se selecciona entre -OH y -NH-(CH₂)_m-COOH y



10

estando m comprendido entre 1 y 10 y preferentemente siendo m igual a 1.

15 6. Derivado de testosterona según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que está en forma de derivado β a nivel del carbono en la posición 3.

7. Derivado de testosterona según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que está en forma de derivado α a nivel del carbono en la posición 3.

20 8. Conjugado constituido de un derivado de testosterona tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y de un marcador.

25 9. Utilización de un derivado de testosterona tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o de un conjugado tal como se describe en la reivindicación 8 para la determinación de la concentración en testosterona en una muestra biológica.

10. Procedimiento de determinación de la concentración en testosterona por inmunoensayo por competición en una muestra biológica, que comprende las etapas que consisten en:

30 a) poner en presencia, dentro de dicha muestra, (i) una pareja de unión de la testosterona y (ii) un compuesto seleccionado entre un derivado de testosterona tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un conjugado tal como se describe en la reivindicación 8, siendo uno de dichos componentes (i) y (ii) adaptado para emitir una señal,

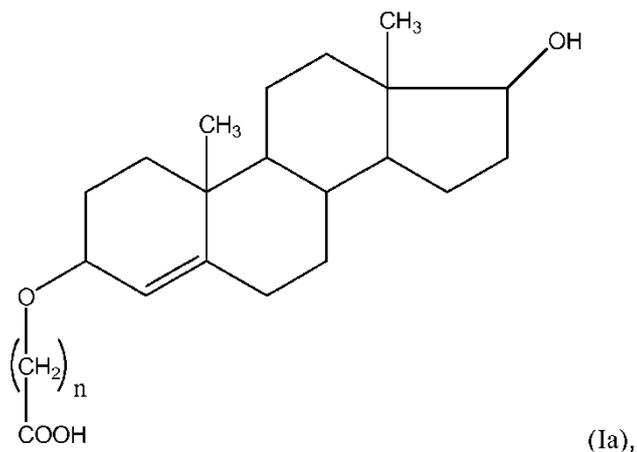
35 b) eventualmente, dejar un lapso de tiempo suficiente para permitir la reacción de competición, y

c) medir la intensidad de la señal y deducir de ella la concentración en testosterona por comparación con una curva de calibración estableciendo una relación entre intensidad de la señal medida y concentración en testosterona.

40 11. Procedimiento de determinación de la concentración en testosterona según la reivindicación 10, caracterizado por que el compuesto (ii) es un conjugado tal como se describe en la reivindicación 8.

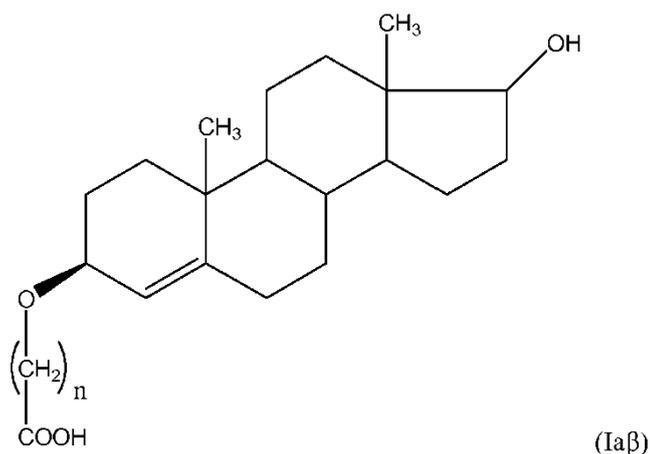
45 12. Kit de diagnóstico que permite la realización del procedimiento según la reivindicación 10 o 11, que comprende un derivado de testosterona tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un conjugado tal como se describe en la reivindicación 8.

13. Utilización de un compuesto de fórmula (Ia) para la preparación de un derivado de testosterona de fórmula (I) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, siendo la fórmula (Ia):



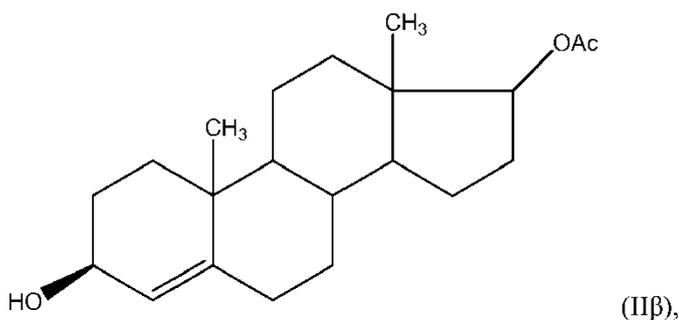
siendo n un número entero comprendido entre 1 y 10.

- 5 14. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (Ia β) siguiente:



10 en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende las etapas que consisten en:

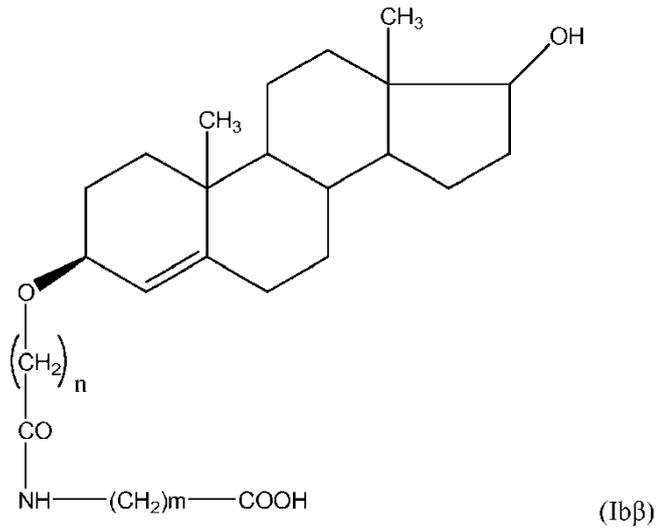
- 15 (1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (II β):



20 en la que Ac significa -CO-CH₃,

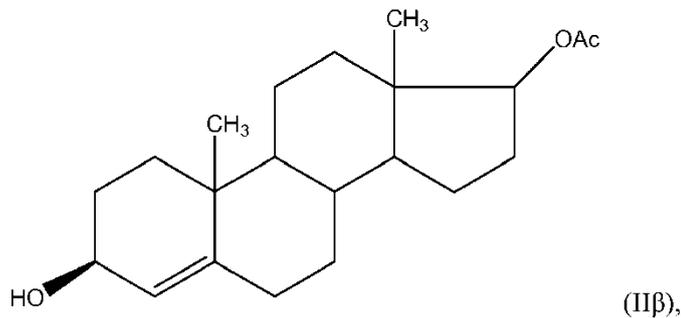
- (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (II β) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ia β).

15. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (Ib β) siguiente:



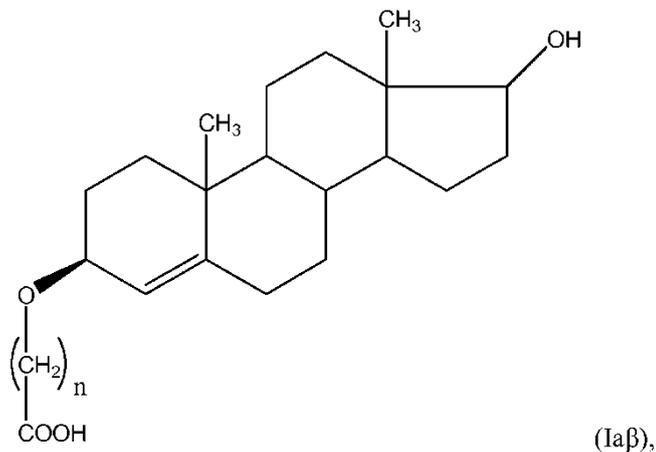
5 en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, m es un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende las etapas que consisten en:

10 (1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (II β):

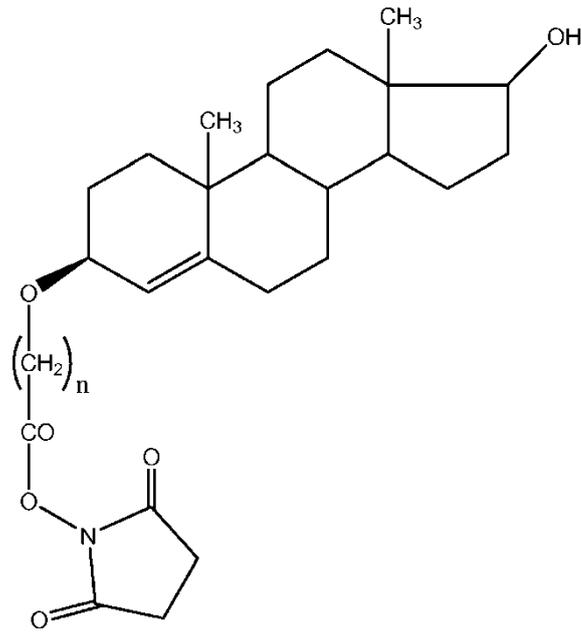


15 en la que Ac significa -CO-CH₃,

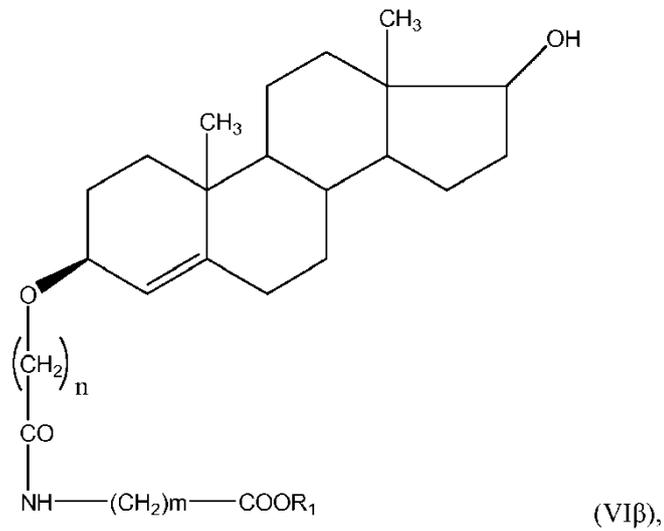
20 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (II β) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ia β):



(3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ia β) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IV β):

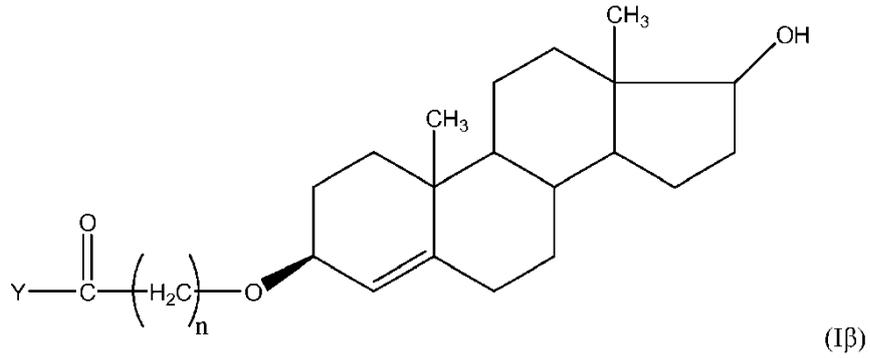


5 (4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IV β) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): H₂N-(CH₂)_m-COOR₁, en la que R₁ es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VI β):



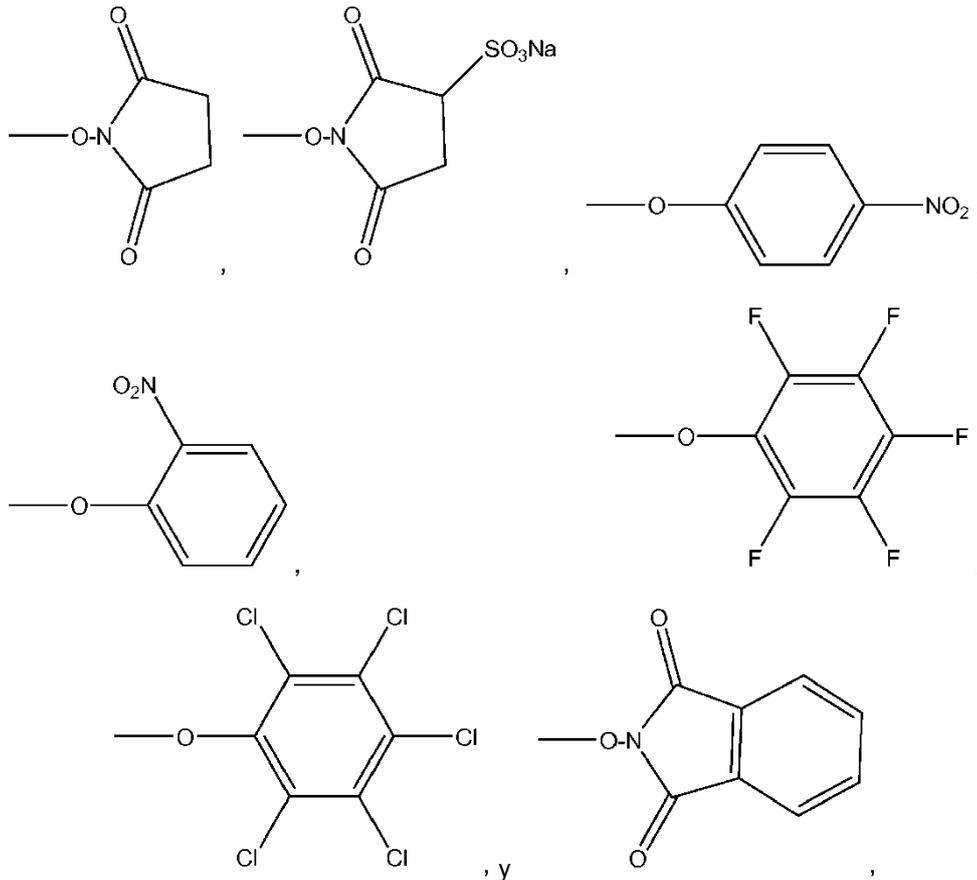
10 (5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VI β) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ib β).

15 16. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (I β) siguiente:



en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa:

5

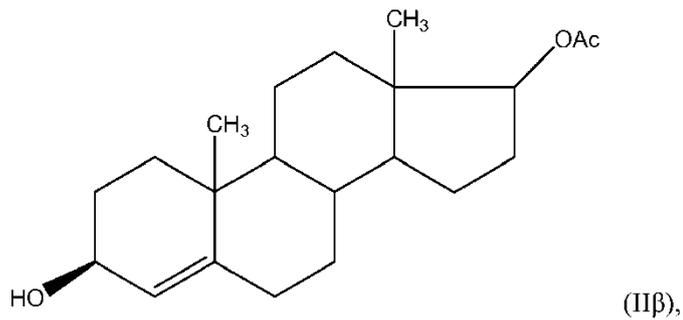


10

que comprende las etapas que consisten en:

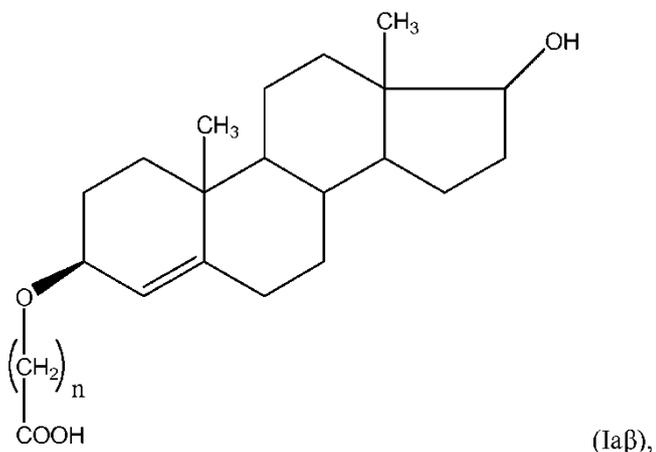
15

(1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (IIβ):

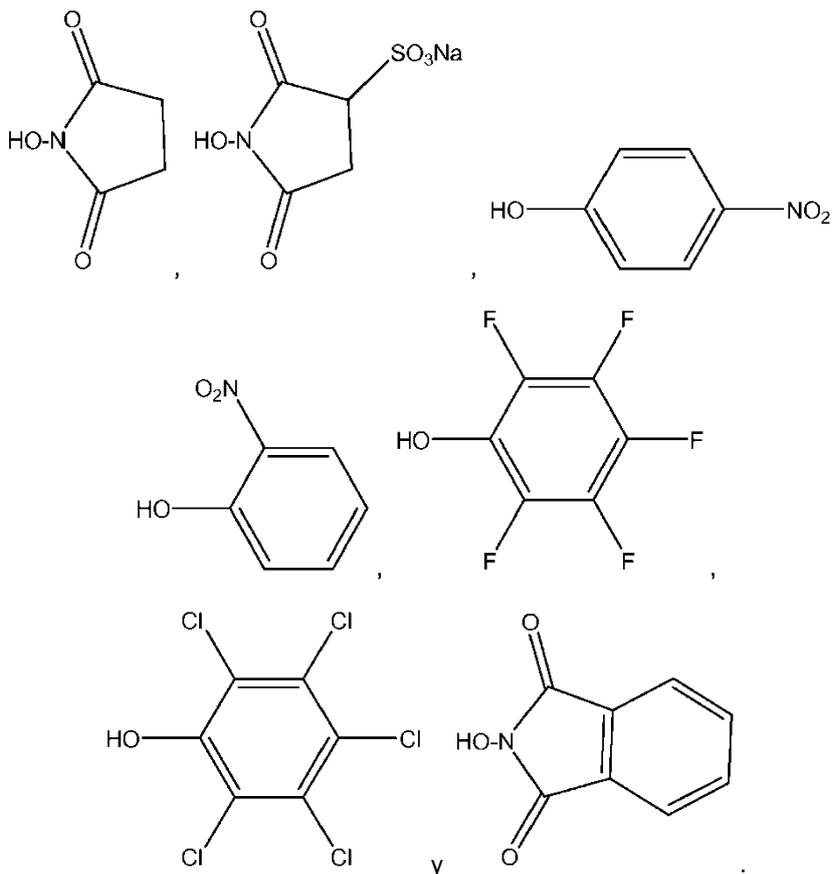


en la que Ac significa -CO-CH₃

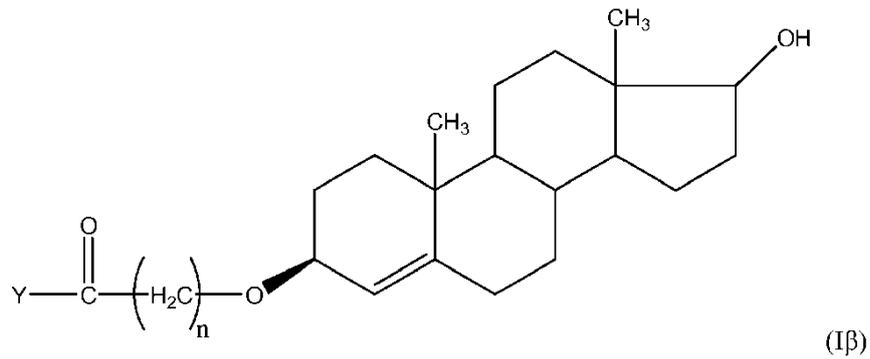
- 5 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IIβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaβ):



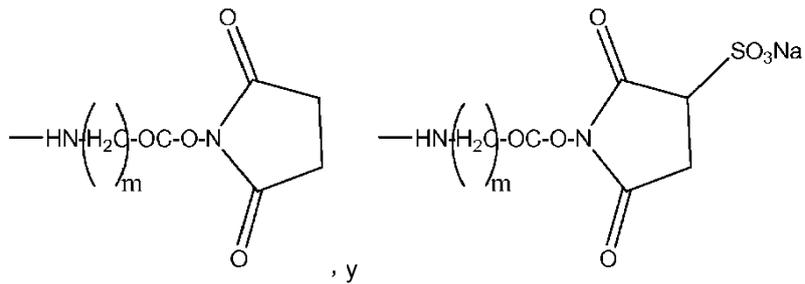
- 10 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaβ) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener los compuestos de fórmula (Iβ):



- 15
- 20 17. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (Iβ) siguiente:



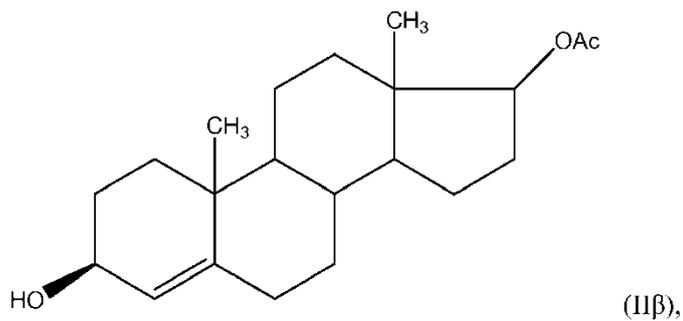
en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa:



5

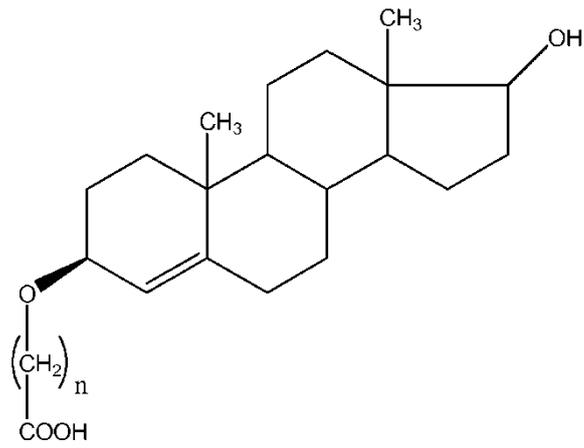
siendo m un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende las etapas que consisten en:

10 (1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (IIβ):



15 en la que Ac significa -CO-CH₃,

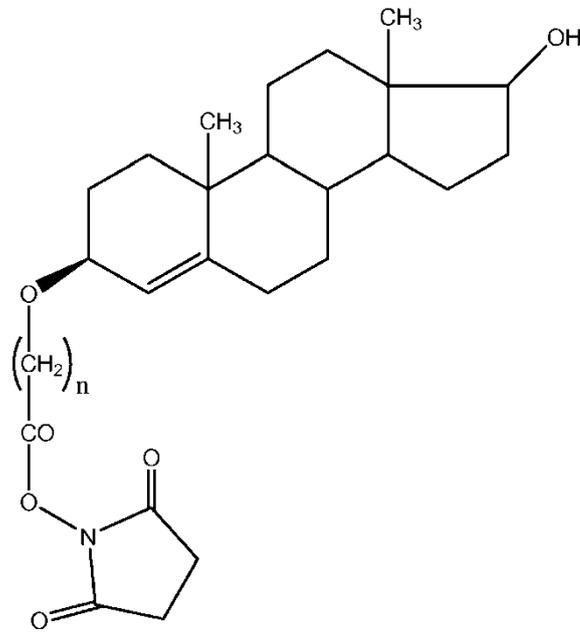
20 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IIβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaβ):



(Iaβ),

(3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaβ) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IVβ):

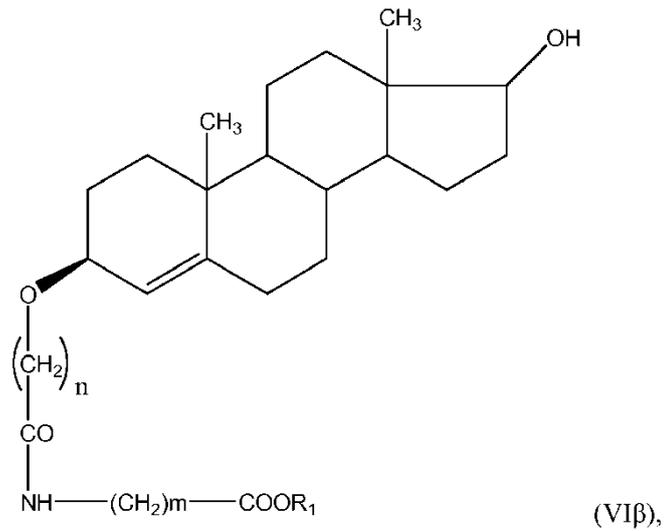
5



(IVβ),

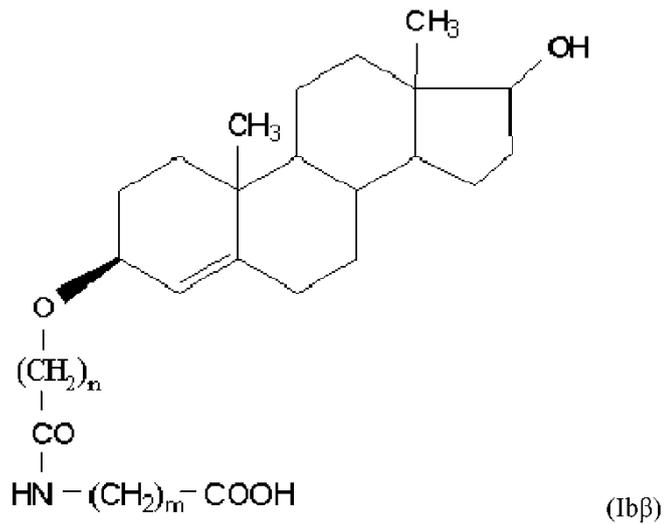
(4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IVβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): H₂N-(CH₂)_m-COOR₁, en la que R₁ es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VIβ):

10



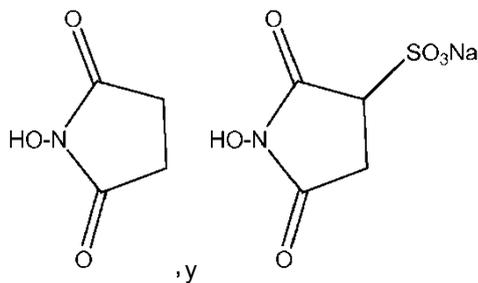
(5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIβ) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ibβ):

5



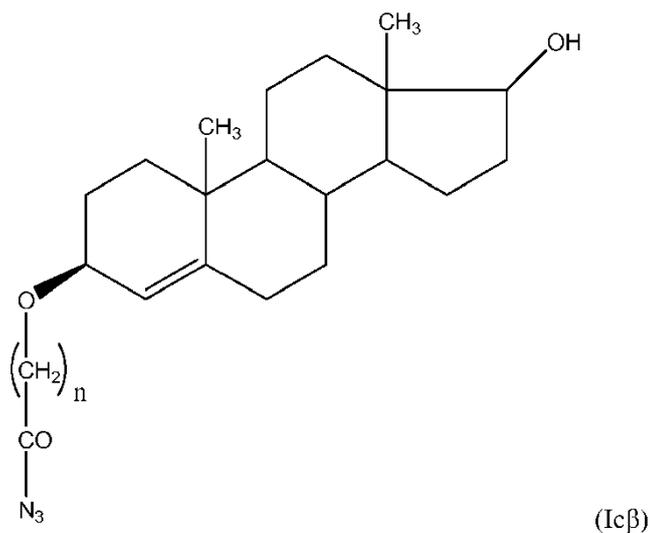
(6) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ibβ) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener los compuestos de fórmula (Iβ):

10



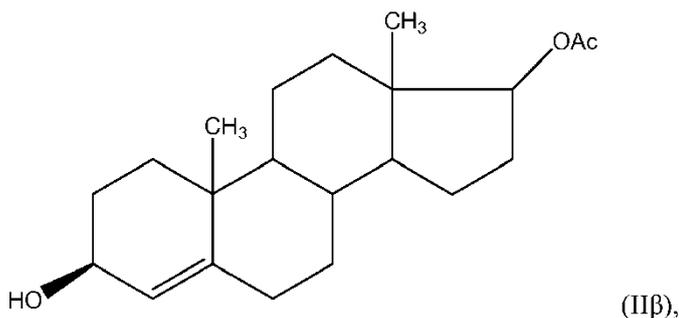
18. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero β en la posición 3, de fórmula general (Icβ) siguiente:

15



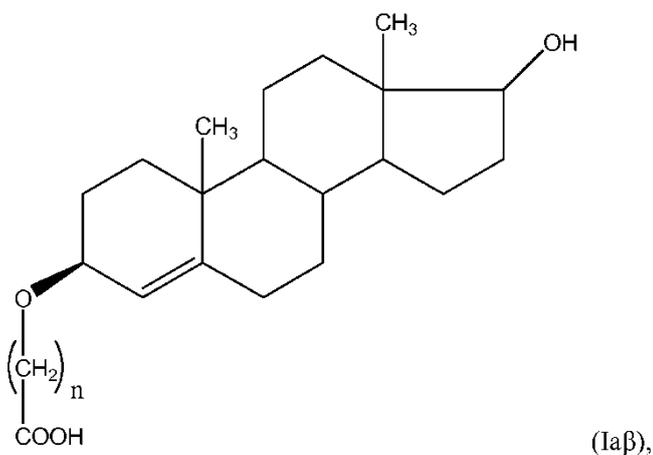
en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende las etapas que consisten en:

- 5 (1) poner a reaccionar la testosterona con anhídrido acético para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (IIβ):

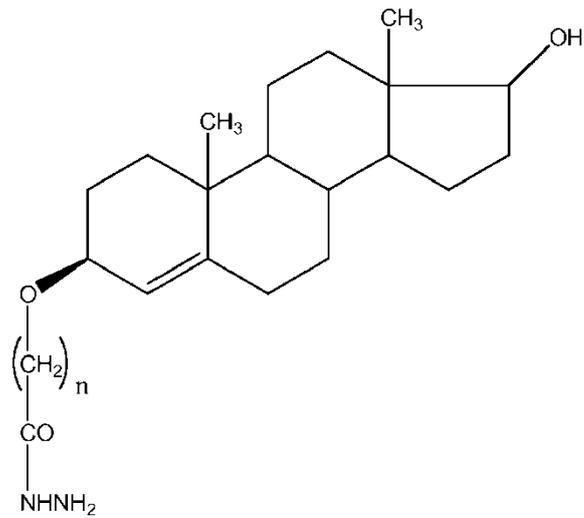


10 en la que Ac significa -CO-CH₃,

- 15 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IIβ) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂-CH-(CH)_n-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaβ):

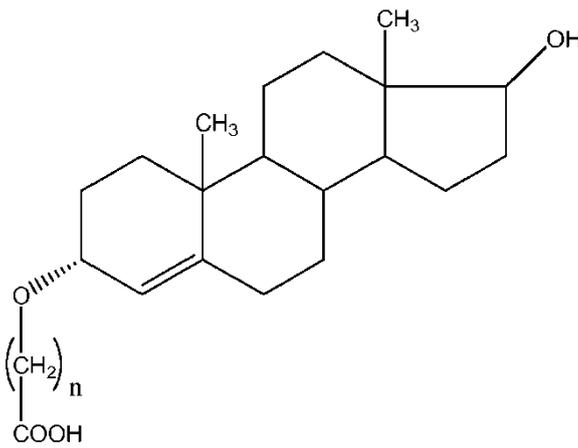


- 20 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaβ) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con du H₂NNH₂, para obtener el compuesto de fórmula (VIIβ):



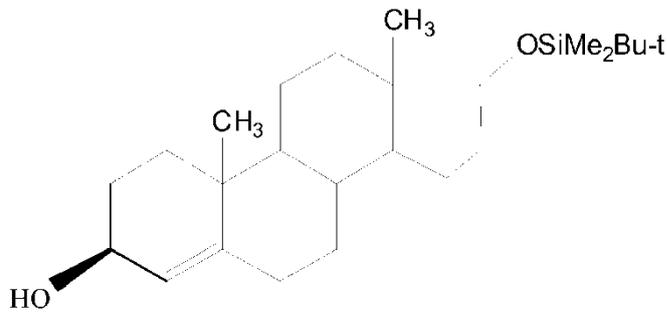
(4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIβ) así obtenido con du HONO para obtener el compuesto de fórmula (Icβ).

5 19. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (Iaα) siguiente:



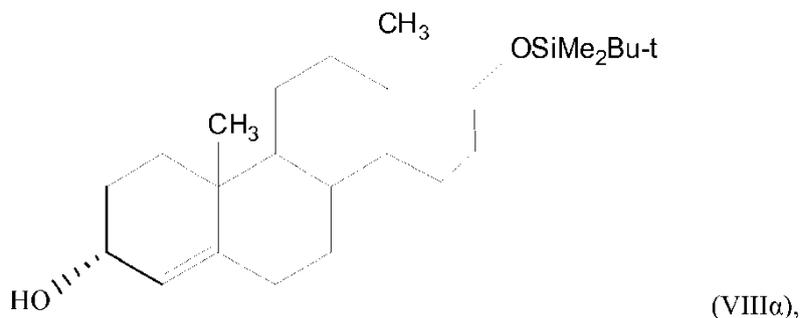
10 en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende las etapas que consisten en:

15 (1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIIIβ):



20 en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

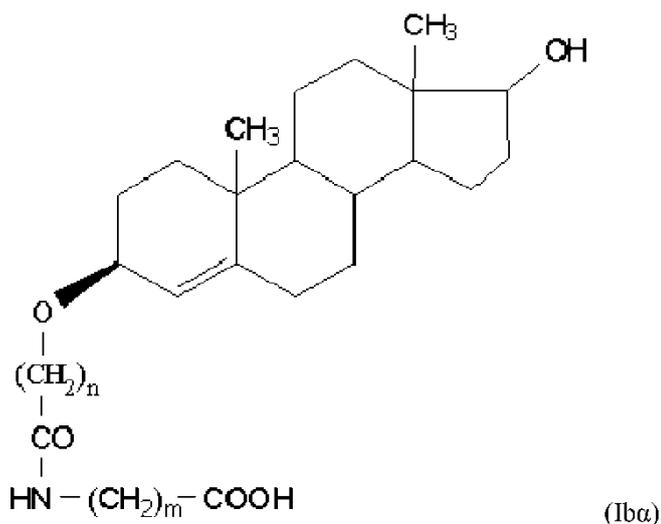
(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII β) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIII α):



en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

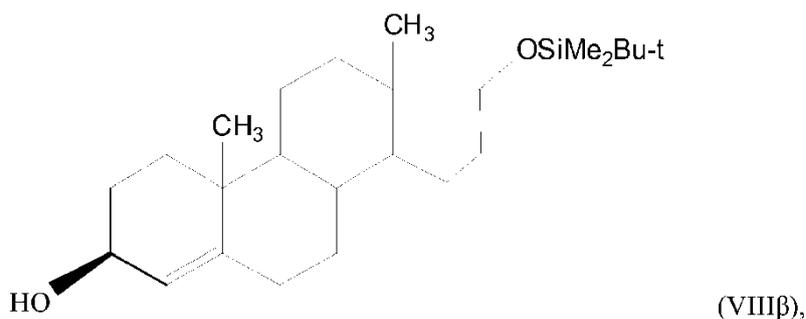
10 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII α) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH)_n-₁COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ia α).

15 20. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (Ib α) siguiente:



en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, m es un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende las etapas que consisten en:

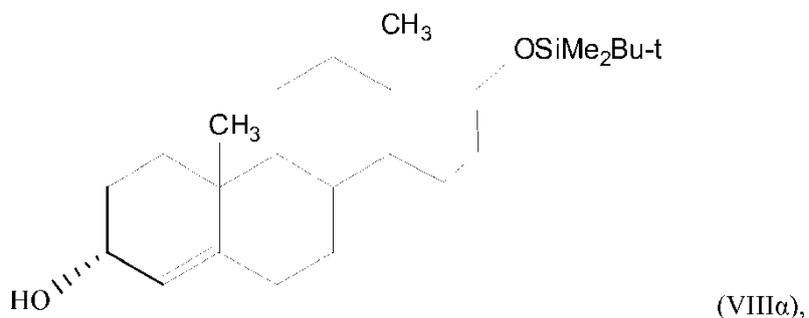
20 (1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIII β):



en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

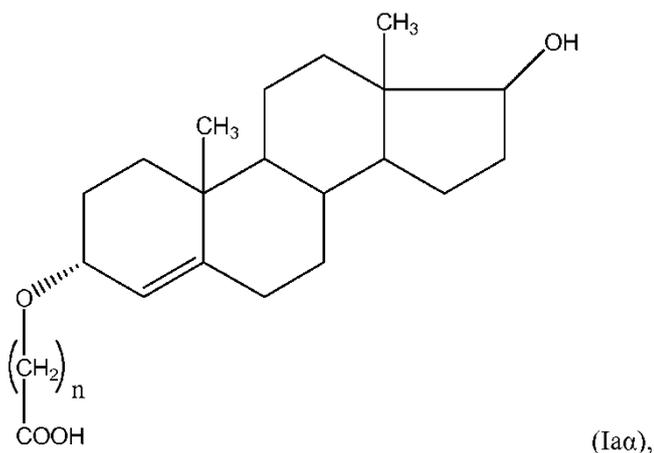
(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII β) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIII α):

5

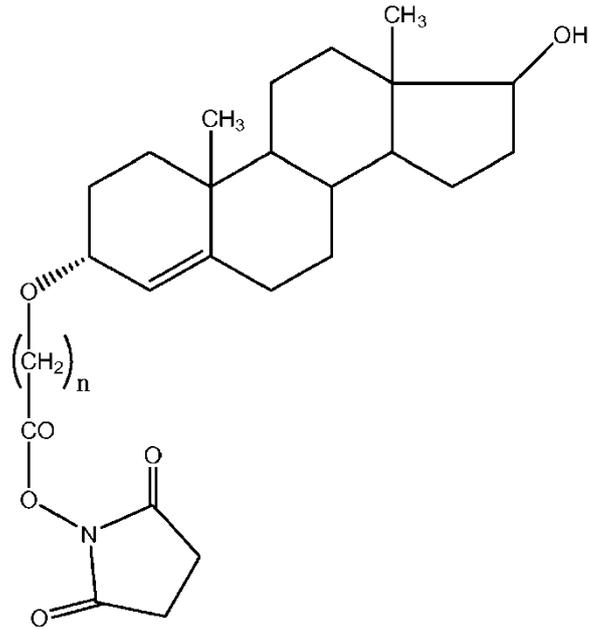


en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

10 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII α) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ia α):

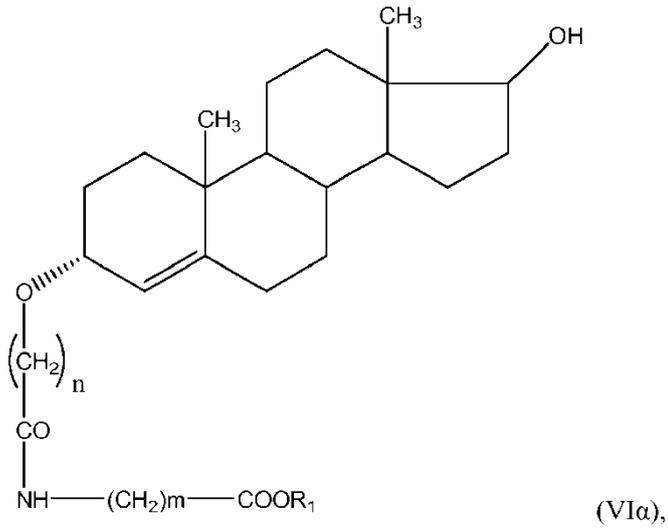


15 (4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ia α) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IV α):



(5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IVα) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): $H_2N-(CH_2)_m-COOR_1$, en la que R_1 es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VIα):

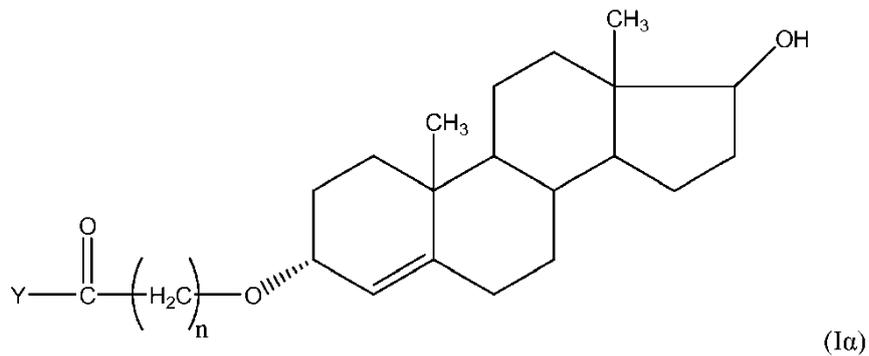
5



(6) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIα) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iα).

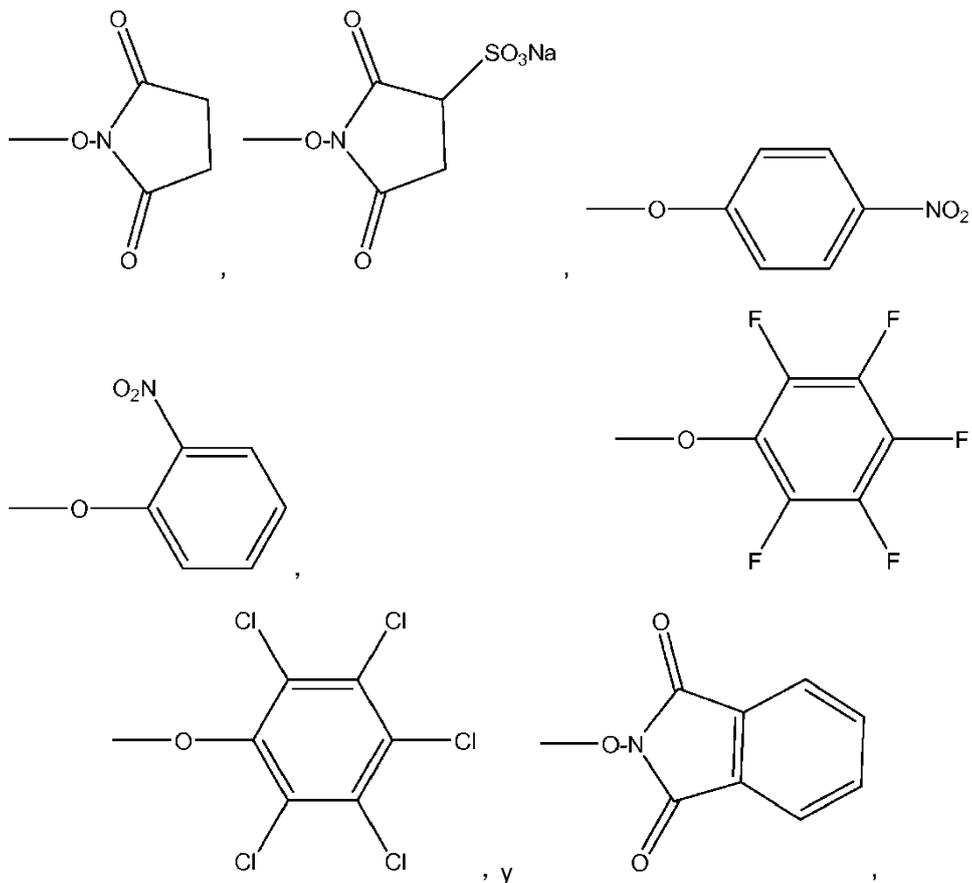
10

21. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (Iα) siguiente:



en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa:

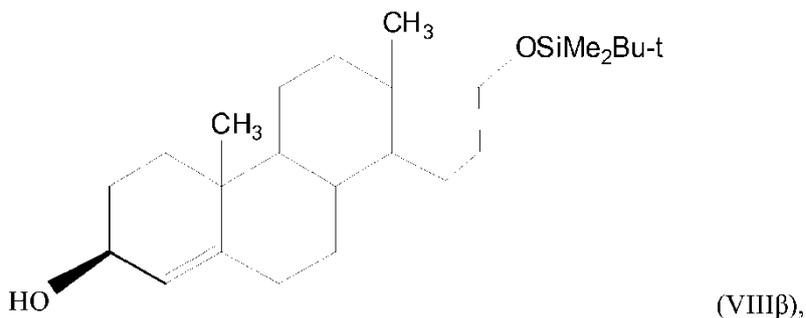
5



10 que comprende las etapas que consisten en:

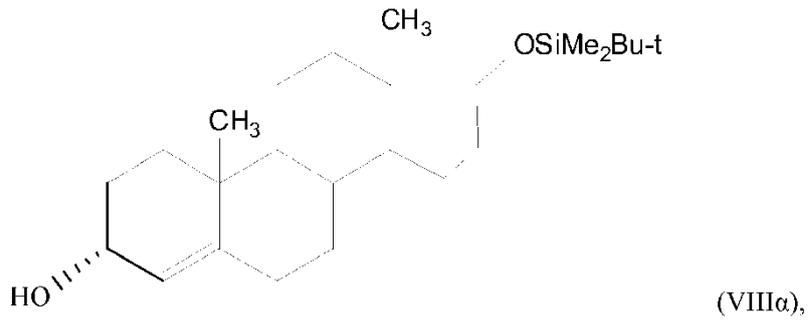
(1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIIIβ):

15



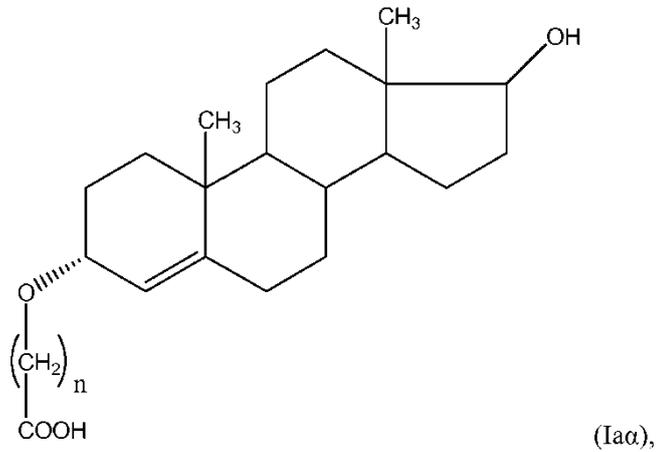
en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

20 (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIβ) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIIIα):

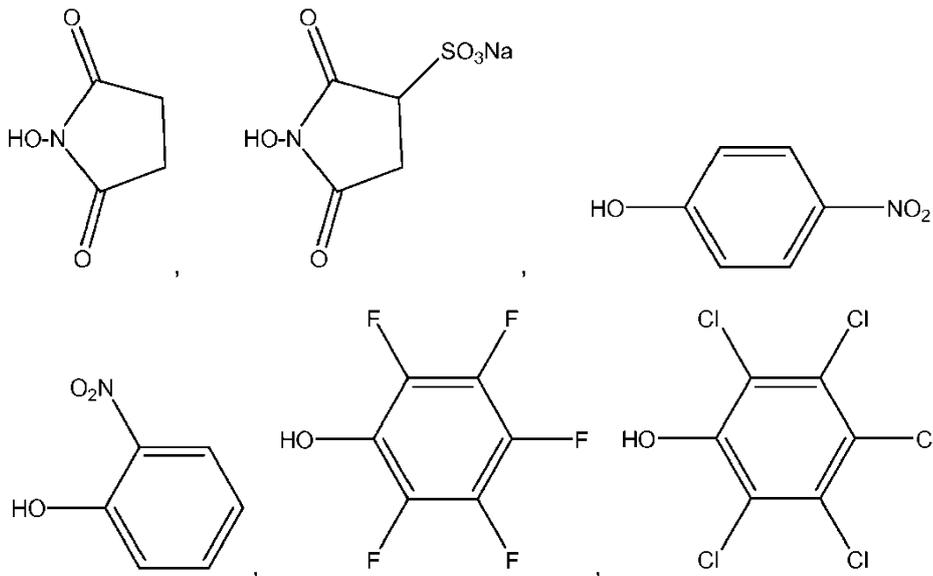


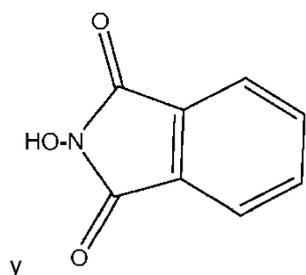
en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

- 5 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIα) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaα):



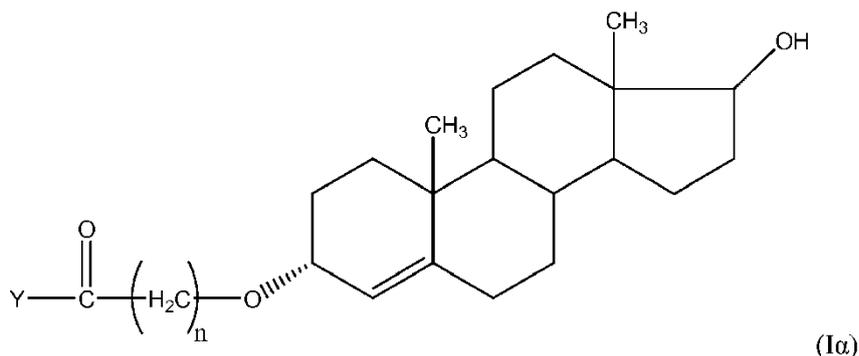
- 10 (4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaα) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener un compuesto de fórmula (Ia):



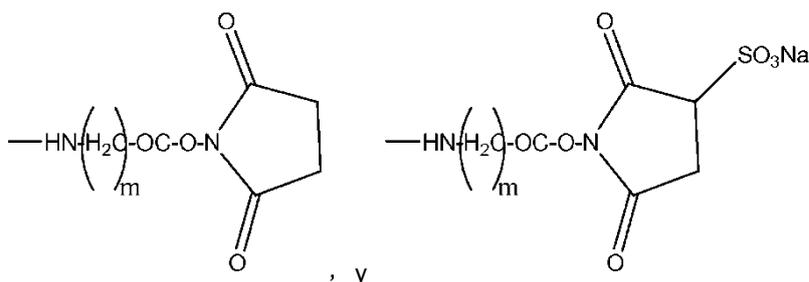


22. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (I α) siguiente:

5



en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10 e Y representa:

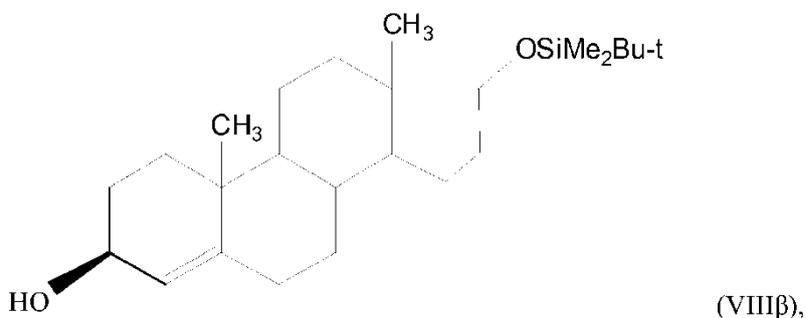


10

siendo m un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende las etapas que consisten en:

(1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIII β):

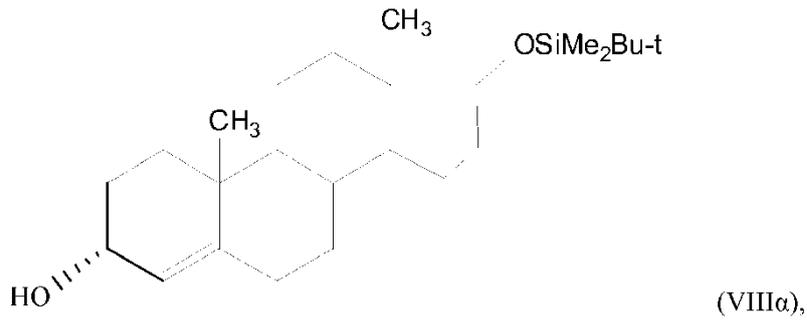
15



20 en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

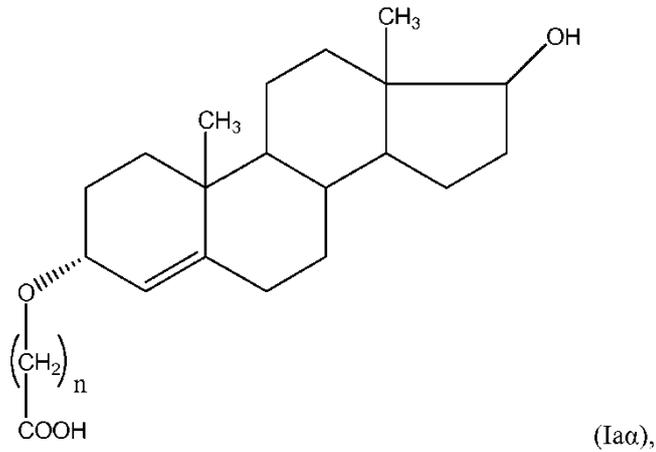
(2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIII β) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIII α):

25

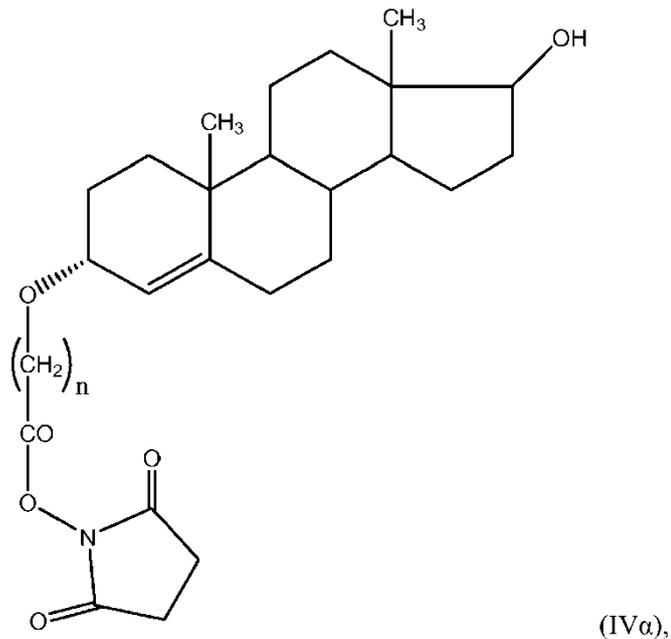


en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

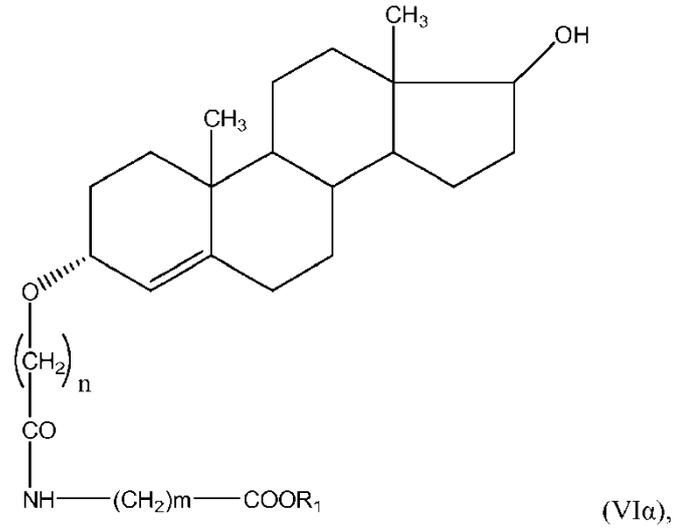
- 5 (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIα) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iaα):



- 10 (4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Iaα) así obtenido con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un derivado de carbodiimida, para producir el compuesto de fórmula (IVα):

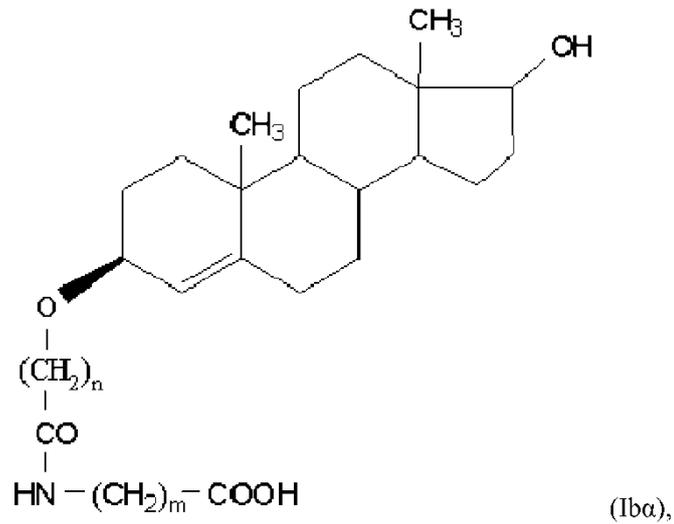


- 15 (5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (IVα) así obtenido con el compuesto de fórmula (V): H₂N-(CH₂)_m-COOR₁, en la que R₁ es un grupo alquilo o arilo, para producir el compuesto de fórmula (VIα):



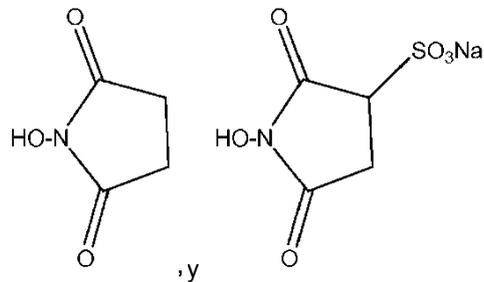
(6) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIa) así obtenido con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Ib α):

5



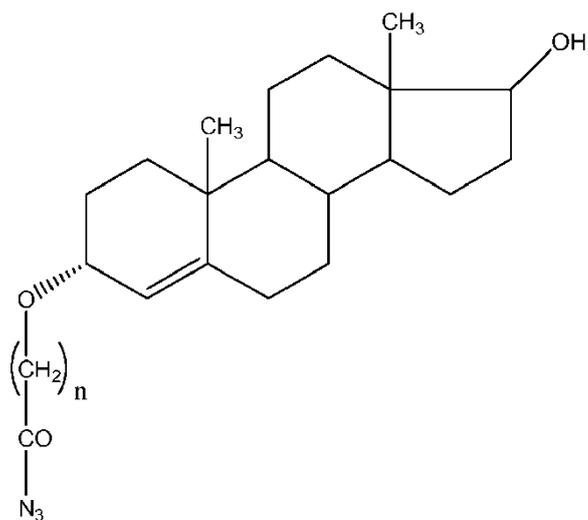
(7) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ib α) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con un reactivo seleccionado, según el grupo Y final, entre los compuestos siguientes, para obtener un compuesto de fórmula (I α):

10



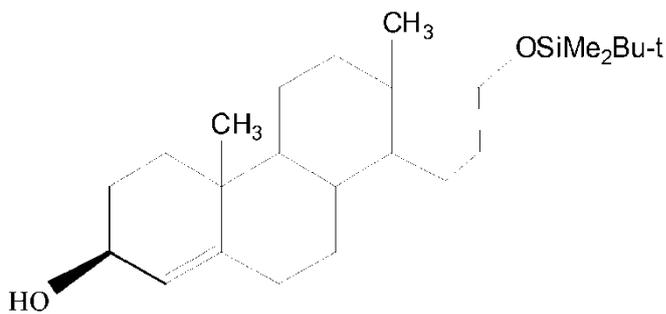
23. Procedimiento de preparación de un derivado de testosterona, en forma de isómero α en la posición 3, de fórmula general (I α) siguiente:

15



en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 10, que comprende las etapas que consisten en:

- 5 (1) poner a reaccionar la testosterona con t-butildimetilclorosilano para proteger la función OH de la posición 17, después con un agente reductor, en presencia de un disolvente, para reducir el carbonilo en la posición 3 y obtener el compuesto de fórmula (VIIIβ):

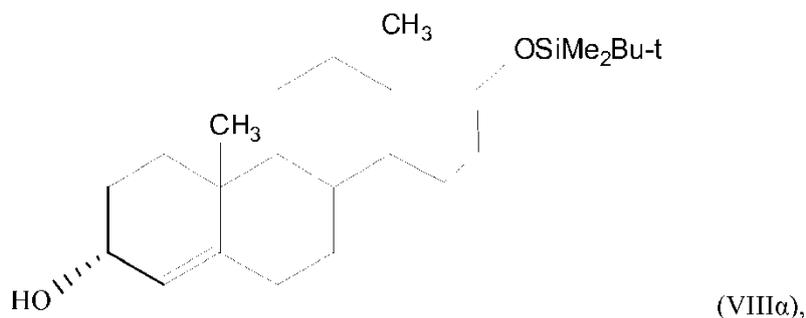


10

en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

15

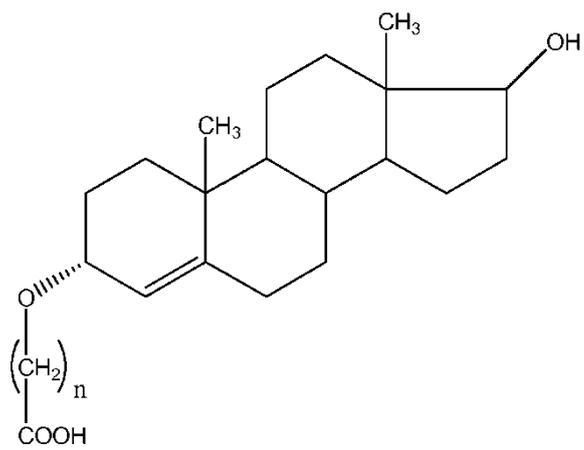
- (2) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIβ) así obtenido con trifenilfosfina, ácido benzoico y azodicarboxilato de dietilo, después con una base, en presencia de un disolvente, para transformar, en la posición 3, el isómero β en isómero α y obtener así el compuesto de fórmula (VIIIα):



20

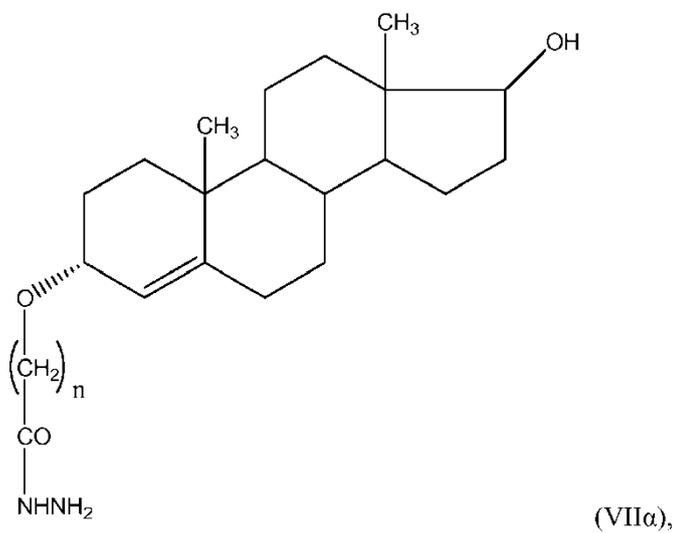
en la que -SiMe₂Bu-t significa t-butildimetilsilanilo,

- (3) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VIIIα) así obtenido con el compuesto de fórmula (III): N₂CH-(CH₂)_{n-1}-COOC₂H₅, después poner a reaccionar con una base, en presencia de un disolvente, para obtener el compuesto de fórmula (Iα):



(4) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (Ia α) así obtenido, en presencia de un derivado de carbodiimida, con du H₂NNH₂, para obtener el compuesto de fórmula (VII α):

5



(5) poner a reaccionar el compuesto de fórmula (VII α) así obtenido con du HONO para obtener el compuesto de fórmula (Ic α).

10

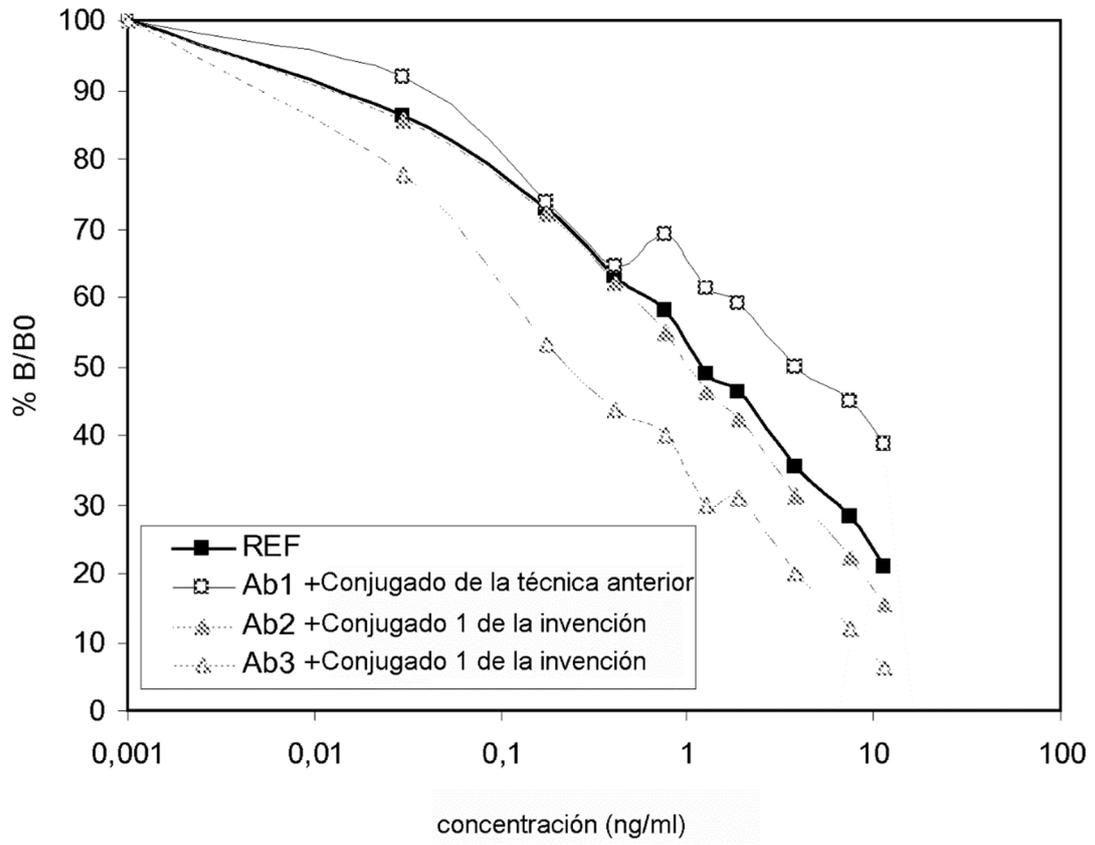


Figura 1

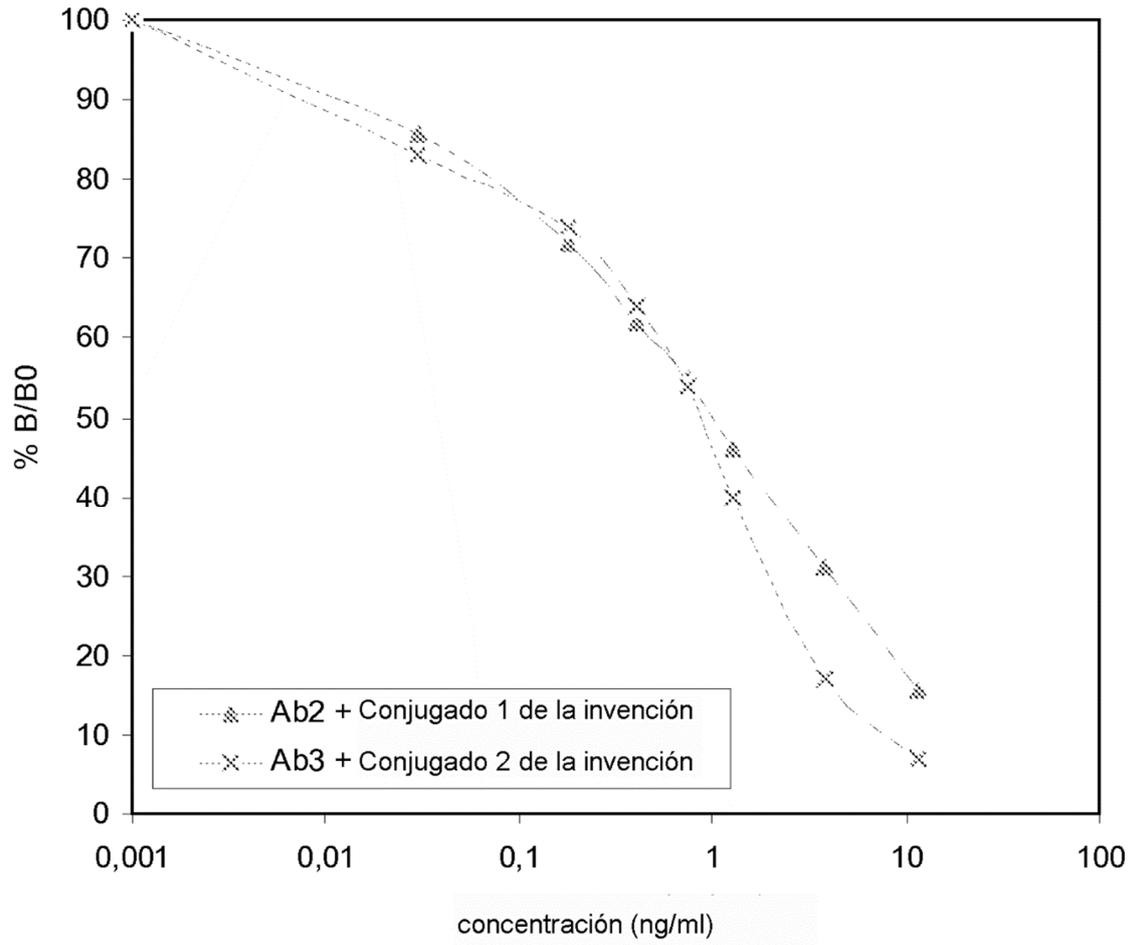


Figura 2